

UNIVERSITÉ DE LYON
FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON
Année 1964 - N° 508

**ÉTUDE DU MÉTABOLISME
ET DE L'ÉLIMINATION
DE LA N-ALLYL-NORMORPHINE :
NALORPHINE**

THÈSE

pour le Doctorat de l'Université de Lyon
Section de Pharmacie

présentée et soutenue publiquement devant
la Faculté Mixte de Médecine et de Pharmacie de LYON

le 1^{er} Juillet 1964

PAR

KONG-CHHOEUM

né le 7 mars 1934
à Sautnikom - Siemréap (Cambodge)

PARIS
JOUBE, ÉDITEUR
15, rue Racine, 15

1964

UNIVERSITÉ DE LYON
FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

Année 1964 - N° 508

**ÉTUDE DU MÉTABOLISME
ET DE L'ÉLIMINATION
DE LA N-ALLYL-NORMORPHINE :
NALORPHINE**

THÈSE

pour le Doctorat de l'Université de Lyon
Section de Pharmacie

présentée et soutenue publiquement devant
la Faculté Mixte de Médecine et de Pharmacie de LYON

le 1^{er} Juillet 1964

PAR

KONG-CHHOEUM

né le 7 mars 1934

à Sautnikom - Siemréap (Cambodge)

PARIS
JOUVE, ÉDITEUR
15, rue Racine, 15

1964

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

PERSONNEL DE LA FACULTÉ

Doyens honoraires :

M. LEPINE J., Membre de l'Institut.
M. HERMANN H., Correspondant
de l'Institut.

Doyen : J.-F. CIER.

Assesseurs : MM. M. LEVRAT.
L. REVOL.

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. COLLET, GUIART, PATEL,
LEPINE, TRILLAT, MOURIQUAND,
MAZEL, GARIN, GATE, MARTIN,

GABRIELLE, SANTY, DUCLOS,
GUILLEMINET, HERMANN,
ROCHET.

PROFESSEURS

MM. CIBERT	Clinique urologique.
PONTHUS (détaché à Beyrouth).	Physique biologique.
DECHAUME	Clinique neuro-psychiatrique et d'hygiène mentale.
CHAMBON	Chimie organique et toxicologie.
WERTHEIMER	Clinique chirurgicale B.
PAUPERT-RAVAULT	Clinique médicale B.
FROMENT	Clinique et prophylaxie cardio-vasculaires.
CROIZAT	Clinique médicale C.
ENSELME	Chimie biologique et médicale.
MALLET-GUY	Clinique chirurgicale A.
REVOL	Pharmacie galénique.
POLLOSSON	Clinique gynécologique.
PIGEAUD	Clinique obstétricale.
BOURRET	Médecine du travail.
LEVRAT	Clinique médicale A.
SOHIER	Hygiène et action sanitaire et sociale.
NETIEN	Botanique et cryptogamie.
BERTRAND	Clinique chirurgicale C.
BADINAND	Chimie analytique pharmaceutique.
DREVON	Pharmacie chimique et pharmacologique.
ROCHE	Médecine légale et déontologie.
COUDERT	Parasitologie et pathologie exotique.
MOUNIER-KUHN	Clinique d'oto-rhino-laryngologie et d'audio-phonologie.
PAUFIQUE	Clinique ophtalmologique.
THIERS	Clinique de dermatologie, syphiligraphie et allergologie.
BRUN	Clinique de pneumo-phtisiologie.
CREYSSSEL	Chaire de clinique chirurgicale orthopédique et traumatologie.
DARGENT	Clinique carcinologique.
GUICHARD	Anatomie pathologique.
GIRARD Paul	Pathologie générale et expérimentale.
LATARJET	Anatomie.
PEYCELON	Pathologie chirurgicale.
GIRARD Marcel	Thérapeutique.
VACHON	Pathologie médicale.
GALY	Physio-pathologie des voies respiratoires.
PAPILLON	Radiologie.
JEUNE	Clinique Médicale infantile et hygiène du premier âge.
GONIN	Hydrologie thérapeutique, climatologie et écologie sociale.

MONNET	Bactériologie.
BANSSILLON	Physiologie et pathologie obstétricales.
CHATONNET	Physiologie B.
GUINET	Clinique endocrinologique.
TRILLAT	Clinique de chirurgie orthopédique.
FREIDEL	Clinique stomatologique.
MARION Joseph	Clinique de chirurgie et d'orthopédie infantiles.
DORCHE	Matière médicale et législation phar- macutique.
DUMONT Louis	Histologie et embryologie.
PERROT	Chimie.
CIER J.-F.	Physiologie A.
PERRIN Jean	Thérapeutique chirurgicale et chirurgie opératoire.
MICHAUD Pierre	Clinique de chirurgie cardiaque.
X.	Biologie médicale et pharmacodynamie.
X.	Clinique des maladies infectieuses.

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

MM. BERGER	Physique nucléaire appliquée à la méde- cine.
BERTOYE	Bactériologie.
MANSUY	Neuro-Chirurgie.
COLLET	Chimie générale et pharmaceutique.
SARROUY	Clinique de pédiatrie.
LACROIX	Hygiène et clinique des maladies des pays chauds.
LIARAS	Clinique chirurgicale propédeutique.
LECUIRE	Neuro-chirurgie.
REVOL	Médecine générale.
GOINARD	Thérapeutique chirurgicale.
CIER André	Pharmacie Chimique et Pharmacologie.

PROFESSEURS SANS CHAIRE

MM. ROMAN	Parasitologie.
FEROLDI	Anatomie pathologique.
MORET	Physique biologique.

MAITRES DE CONFÉRENCES AGRÉGÉS-TITULAIRES

MM. CREYSEL Roger	Chimie biologique.
THIVOLET	Hygiène.
GARIN	Parasitologie.
PINET	Electro-radiologie.
ODDOUX	Botanique et cryptogamie.
de SOLLIERS	Chimie analytique.
TOLOT	Médecine du travail.
DESPIERRES	Médecine générale.
GUYOTAT	Neuro-psychiatrie.
DESCOTTES	Chirurgie générale.
JOUVET	Pathologie expérimentale.
PEYRIN	Physique biologique.
TOMMASI	Anatomie pathologique.
BUFFARD	Electro-radiologie.
LEJEUNE	Médecine générale et thérapeutique.
de MOURGUES F.	Stomatologie.
NAUSSAC	Maladies infectieuses.
REBOUILLAT	Chirurgie générale.
ROMAGNY	Pédiatrie.
DELAHAYE J.-P.	Médecine générale.
DELEUSE	Anesthésiologie.
GIRAUD	Electro-radiologie diagnostic et théra- peutique.

MICHEL	Anesthésiologie.
FRANÇOIS	Pédiatrie et puériculture.
MICHOULIER	Chirurgie générale.
COLOMB	Dermatologie.
LAMBERT	Médecine générale.
FRIES	Médecine générale.
GILLY	Pédiatrie.
ROBERT	Médecine générale.
BOUCHET	Anatomie.

MAITRES DE CONFÉRENCES AGRÉGÉS STAGIAIRES

MM. DUROUX	Anatomie.
BRETTE	Thérapeutique.
FAVRE-GILLY	Hématologie.
GIROD	Histologie et embryologie.
GRAS	Chimie biologique.
MALLEIN	Chimie analytique.
RIFFAT	Hygiène.
FAUCON	Biologie médicale et pharmacodynamie.
FLANDROIS	Physiologie.
VIALLIER-RAYNARD	Bactériologie.

AGRÉGÉS EN EXERCICE

MM. BURTHIAUT	Obstétrique.
GIGNOUX	Oto-rhino-laryngologie.
GUILLEMIN	Chirurgie générale.
JAUBERT de BEAUJEU	Chirurgie générale.
MARION Pierre	Chirurgie générale.
PLAUCHU	Chirurgie générale.
PONT	Médecine générale.
SAUTOT	Chirurgie générale.
TRAEGER	Médecine générale.
VIGNON	Médecine générale.
BONAMOUR	Ophtalmologie.
COLIN	Médecine légale.
de MOURGUES Georges	Chirurgie générale.
DEVIC	Médecine générale.
DUMONT Martial	Obstétrique.
DURAND	Urologie.
FRANCILLON	Chirurgie générale.
SAUBIER	Chirurgie générale.
SCHOTT	Neuro-psychiatrie.
ALLEGRE	Neuro-chirurgie.
CHASSARD	Electro-radiologie.
FAYSSE	Orthopédie.
GAILLARD	Oto-rhino-laryngologie.
GARDE	Médecine générale.
HUGONNIER	Ophtalmologie.
KALB	Pneumo-phthisiologie.
LARBRE	Médecine générale.
MARET	Chirurgie générale.
MORNEX	Médecine générale.
NORMAND	Médecine générale.
PERRIN André	Médecine générale.
BETHENOD	Pédiatrie et puériculture.
DUMAS	Stomatologie.
GARMIER	Obstétrique.
NOEL	Médecine générale.
SCHNEPP	Orthopédie.

Examineurs de la Thèse :

MM. : M. CHAMBON, Président.
L. ROCHE.
L. PERROT.
J. GRAS



A SON ALTESSE ROYALE LE PRINCE NORODOM SIHANOUK

Chef de l'Etat du Cambodge

Symbole de Paix et d'Union Nationale.

Qu'Elle daigne accepter le modeste témoignage de notre fidèle attachement et l'hommage de notre profonde gratitude.

A LA MEMOIRE DE MES PARENTS

A LA MEMOIRE DE NOTRE AMI ING-SENG

A MADAME ANG LOEUM

En témoignage de ma profonde reconnaissance.

A MES BEAUX-PARENTS

*Puisse ce travail leur apporter le témoignage
de notre respect et de notre affection.*

A SON ALTESSE NORODOM-THULAVANN

Nous ne pourrions jamais oublier tout ce qu'Elle a fait pour nous.

Nous La prions d'accepter le témoignage de notre reconnaissance.

A MA FEMME

C'est en elle que j'ai trouvé le réconfort au cours de ce travail.

Je l'assure de mon profond amour.

A MA FILLE KONG-SOTHEAVY

Avec tout mon amour paternel.

A MES FRÈRES :

KONG-YOEUM, KONG-ROEUN

A MA SŒUR :

MADAME MUTH-KHUTH, née KONG-LOM-ANG

A MON BEAU-FRÈRE : MUTH-KHUTH

A MA BELLE-SŒUR : M^{me} KONG-YOEUM, née YIM-SAO-YUNG

A MON BEAU-FRÈRE ET A MA BELLE-SŒUR : M. ET M^{me} OR-KOSALAK

A MES ONCLES ET TANTES

A TOUS MES NEVEUX ET NIÈCES

A M. ET M^{me} ONG-LE-KIM-SUOR

A M^{lle} OR-SAMUN

En gage de mon affection.

A MES AMIS :

KHUON-CHHIEK

SUN-SAVOUN

KHAM-CHINN

IN-CHHAY-SUN

HING-SOKHOM

M. ET M^{me} LON-KENG

M. ET M^{me} KHENG-DIER

M. LE DOCTEUR SO-SATTA ET MADAME

M. SO-SATTEYA

M. LE PHARMACIEN SIN-THIM

M. LE PHARMACIEN OUNG-BORAN ET MADAME

M. LE PHARMACIEN LY-SE ET MADAME

M. LY-BAYSY

M. LE DOCTEUR CHUM-CHANHOLL ET MADAME

En gage de mes sincères amitiés.

A NOTRE MAÎTRE ET PRÉSIDENT DE THÈSE

MONSIEUR LE PROFESSEUR MARC CHAMBON

Professeur de Chimie Organique et de Toxicologie,
Membre correspondant de l'Académie de Médecine

*Il nous a prodigué avec bienveillance, ses
conseils et ses encouragements au cours de ce
travail.*

*Nous gardons de lui l'image d'un maître
rayonnant de logique et d'esprit critique rigou-
reux.*

*Qu'il veuille bien trouver ici l'hommage de
notre gratitude et de notre profond respect.*

A MONSIEUR LE PROFESSEUR LOUIS ROCHE
Professeur de Médecine légale et de Déontologie,
Médecin des Hôpitaux

*Il a bien voulu accepter de faire partie de
nos juges.*

*Nous lui présentons l'assurance de notre
entière gratitude.*

A MONSIEUR LE PROFESSEUR LOUIS PERROT
Professeur de Chimie,
Pharmacien des Hôpitaux

*Nous savons l'intérêt et l'attention qu'il porte
à notre travail.*

*Nous lui sommes très reconnaissant d'avoir
bien voulu accepter de siéger à notre thèse.*

A MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ JEAN GRAS
Agrégé de Chimie biologique

*Nous le remercions vivement d'avoir consenti
à juger ce travail et nous le prions de trouver
ici le témoignage de notre reconnaissance.*

A MONSIEUR LE LIEUTENANT-GÉNÉRAL LON-NOL
Ministre d'Etat
Chef d'Etat Major des Forces Armées Royales Khmères

A SON ALTESSE LE LIEUTENANT-COLONEL SISOWATH-METHAVI
Attaché Militaire, Naval et de l'Air, près l'Ambassade Royale du Cambodge
en France

A MONSIEUR LE MÉDECIN LIEUTENANT-COLONEL KANG-KENG

A MONSIEUR LE MÉDECIN-LIEUTENANT-COLONEL THAI-SYCHIN

A MONSIEUR LE CAPITAINE NGUON-PYTOURETH,
Attaché Militaire, Naval et de l'Air adjoint

A MONSIEUR LE MÉDECIN GÉNÉRAL BORON,

Professeur agrégé du Val-de-Grâce
Directeur de l'Ecole du Service de Santé Militaire

A TOUS NOS AMIS ET CAMARADES
DE L'ECOLE DU SERVICE DE SANTE MILITAIRE

A MONSIEUR PIERRE CHAMBON

Son expérience a contribué à enrichir nos connaissances.

Qu'il veuille bien accepter nos sincères remerciements.

A MADAME YVONNE GOUTTENOIRE

Nous tenons particulièrement à la remercier pour son aide et son encouragement.

INTRODUCTION

Une des découvertes les plus intéressantes de ces dernières années, est l'observation des propriétés pharmacologiques de la nalorphine. Cette drogue qui a une structure chimique étroitement semblable à celle de la morphine, ne possède pratiquement pas une de ses propriétés utilisables et est, au contraire, son antagoniste le plus efficace en ce qui concerne la dépression respiratoire. En effet, c'est en tant qu'antidote de la dépression respiratoire induite par la morphine et ses congénères et des composés synthétiques pharmacologiquement semblables à la morphine que la nalorphine est employée à l'heure actuelle.

La possibilité de synthèse de ce composé particulier résultait des travaux de Von Braun (191) en 1914 sur la déméthylation de la morphine et de la codéine donnant naissance respectivement à la normorphine et à la norcodéine.

L'enlèvement du groupement méthyl sur l'atome d'azote, de la morphine ou de la codéine donne un composé ayant l'effet analgésique considérablement réduit [Heimann (86)] mais la substitution d'un radical allyl au radical méthyl de la codéine produit un composé qui, à doses modérées a peu d'effets, mais à larges doses, provoque des effets excitants et tétaniques et abolit ou prévient les effets toxicomaniques et dépressifs respiratoires de la morphine. Ce composé, qui est la N-allylnorcodéine, fut synthétisé par Pohl (153) et Von Braun (190). Ces deux auteurs avaient rapporté que la N-allylnorcodéine est capable de réveiller temporairement les chiens endormis par la morphine.

Guidés sans doute par l'idée selon laquelle les composés N-substitués des drogues narcotiques sont antagonistes des composés initiaux, Mc Cawley et coll. (119) et Weijlard et coll. (193) avaient fait la synthèse de la N-allylnormorphine, dont les propriétés antagonistes de la morphine étaient démontrées d'abord par Hart (81) (82), par Hart et coll. (83) et par Unna (186) et ensuite par plusieurs autres auteurs [Adriani et coll. (1), Cappe et coll. (27), Dulfano et coll. (49), Eckenhoff et coll. (53) (54) (56), Hazard (84), Hazard et coll. (85), Irwin et coll. (93), Marx et coll. (117), Orton et coll. (143), Papadopoulos et coll. (148), Salomon et coll. (158), Smith et coll. (170)].

La parenté entre la nalorphine et la morphine ne réside pas uniquement sur le plan structural, mais aussi sur deux autres plans : sur le plan métabolique et sur le plan analytique.

Sur le plan métabolique :

Les travaux antérieurs sur la morphine [Axelrod (6), Axelrod et coll. (8), Mellett et coll. (121), Takemori (178) (179), Takemori et coll. (180)] et sur la nalorphine [Axelrod et coll. (8), Milthers (126), Seibert et coll. (164), Woods (201), Woods et coll. (207)], convergent pour démontrer que ces deux produits possèdent les mêmes voies métaboliques dans l'organisme, à savoir : la déalkylation, la conjugaison et l'élimination urinaire sous forme libre et sous forme liée. Cependant, bien que la nature chimique de la morphine liée soit parfaitement connue comme étant un « 3 monoglycuronide » [Fujimoto et coll. (68) (88), Seibert et coll. (165), Woods (203), Woods et coll. (205)], celle de la nalorphine n'est pas encore bien établie. En effet, seuls les travaux de Axelrod et coll. (8) avaient fourni une preuve indirecte de la présence de glycuronide de nalorphine en partant des observations suivantes :

- La nalorphine conjuguée est hydrolysée par le β glycuronidase.
- La nalorphine et l'acide glycuronique en présence d'homogénéisats de foie de rat donnent naissance à la nalorphine conjuguée.

Un des buts de notre travail est de chercher d'abord à isoler par chromatographie, et ensuite à caractériser par des réactions colorées, le glycuronide de nalorphine éliminé par les urines ou par la bile des chiens injectés de nalorphine, et par là de fournir une preuve indiscutable de la présence de glycuronide de nalorphine. •

Sur le plan analytique :

La morphine et la nalorphine ne se différencient que par le groupement alcoyl fixé sur l'atome d'azote : groupement méthyl dans le cas de la morphine et groupement allyl dans le cas de la nalorphine. Sauf le spectre d'absorption dans l'infra-rouge, la nalorphine donne les mêmes colorations avec les réactifs classiques de la morphine [Pedley (151)]. Comme l'avait mentionnée Pedley, seule la chromatographie de partage sur papier serait une méthode simple et excellente pour différencier la morphine de la nalorphine [Milthers (126) (127), Pedley (151), Street (175)].

En considérant l'éventuelle administration de la nalorphine au cours des dépressions respiratoires pouvant survenir lors de l'emploi de la morphine ou de divers dérivés de celle-ci, il nous est apparu intéressant de chercher à individualiser la nalorphine dans les excréments et par la suite, d'en étudier le métabolisme.

Par conséquent, nous envisagerons :

1. — L'étude de la distribution de la nalorphine chez le chien.

2. — L'étude de la nature de la nalorphine conjuguée.

3. — La caractérisation de la nalorphine et la différenciation entre la morphine et la nalorphine par chromatographie.

Nous avons adopté pour ce travail le plan suivant :

PREMIÈRE PARTIE : *Généralités.*

CHAPITRE I : Préparation — Constitution chimique — Propriétés physico-chimiques — Réactions colorées.

CHAPITRE II : Propriétés pharmacologiques et emploi thérapeutique.

CHAPITRE III : Métabolisme.

DEUXIÈME PARTIE : *Exposé des travaux antérieurs.*

TROISIÈME PARTIE : *Travaux personnels.*

QUATRIÈME PARTIE : *Discussion.*

CINQUIÈME PARTIE : *Conclusion.*

SIXIÈME PARTIE : *Bibliographie.*

PREMIÈRE PARTIE

CHAPITRE I

Préparation.

La nalorphine est préparée suivant la méthode de Weijlard et Erickson (193) qui est une modification de la méthode de McCawley et coll. (119).

La technique de cette méthode est la suivante :

— On chauffe 35 g de normorphine avec 7,95 g de bromure d'allyle dans 350 ml de chloroforme, en tube scellé pendant 3 heures et demie à 110°C.

— Le produit de la réaction est filtré et le résidu lavé avec du chloroforme.

— La solution chloroformique est évaporée à sec sous vide et le résidu est trituré avec 75 ml d'éther, puis le tout refroidi dans un bain de glace et filtré.

— Le produit brut est soumis à l'extraction par l'éther dans un appareil de Soxhlet pendant 15 heures.

— L'éther extractif est concentré en absence d'air jusqu'à cristallisation commençante et refroidi dans un box de glace toute la nuit.

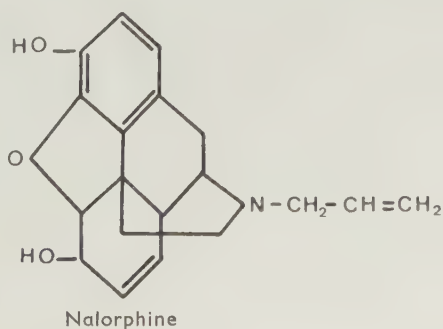
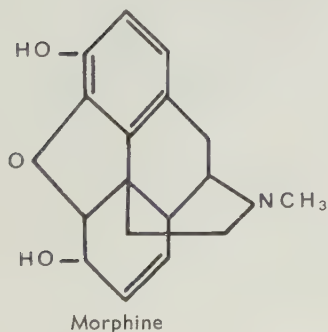
Les cristaux blancs sont ensuite collectés et lavés avec un peu d'éther et séchés sous vide.

Constitution chimique :

La N-allylnormorphine ou nalorphine ou nalline diffère de la morphine uniquement par son groupement allyl fixé sur l'azote.

Son poids moléculaire est de 311,2 correspondant à la formule brute $C_{19}H_{21}O_3N$.

Sa formule développée :



Propriétés physico-chimiques.

La nalorphine base fond à 208°-209°C, est soluble dans le chloroforme, l'éthanol et l'acétone, mais faiblement soluble dans l'éther ou l'eau [Weijlard et coll. (193)].

Le bromhydrate fond à 258°-259°C, soluble dans l'eau et peut être recristallisé dans l'éther [Weijlard et coll. (193)].

Le chlorhydrate fond à 260°-270°C et montre un pouvoir rotatoire spécifique (α) $\frac{25^\circ\text{C}}{\text{D}} = -115^\circ$ à -120° en solution dans le méthanol (6 % P/V) [Cooper (36), Council on Pharmacy and Chemistry (38)]. C'est une poudre microcristalline blanche, inodore, très soluble dans l'eau, peu soluble dans le chloroforme et insoluble dans l'éther.

Une solution aqueuse de chlorhydrate de nalorphine possède le maximum et le minimum d'absorption dans l'ultra-violet respectivement à 285 m μ et à 260 m μ tout comme une solution aqueuse de chlorhydrate de morphine car cette absorption est due au noyau phénanthrénique [Seagers et coll. (161)]. Cependant elle peut servir à des déterminations quantitatives sur du matériel pur [Seagers et coll. (161)].

La nalorphine possède un spectre d'absorption dans l'infra-rouge caractéristique permettant de la différencier de la morphine [Seagers et coll. (161)]. Selon Woods (201), la nalorphine est légèrement plus basique que la morphine.

Réactions colorées.

Presque toutes les réactions colorées de la morphine sont données par la nalorphine. En effet, Pedley (151) et nous-mêmes, avons vérifié que les réactions avec les réactifs de Marquis, de Mandelin, de Mecke, de Froehde, l'acide nitrique donnent des colorations rigoureusement semblables à celles données par la morphine.

D'autre part, nous avons pu vérifier que les réactions suivantes, données à la fois par la morphine et la nalorphine, ne permettent pas de différencier ces deux composés :

— Libération d'iode des iodates en milieu acide.

— Formation de bleu de Prusse avec le mélange extemporané de solution de ferricyanure de potassium et de solution de perchlorure de fer.

A côté de ces réactions communes à la morphine, la nalorphine possède aussi quelques réactions particulières, surtout des réactions microcristallines qui, selon Pedley (151), bien qu'elles ne donnent pas de beaux cristaux avec la nalorphine, permettent sa différenciation d'avec la morphine.

Ces réactions microcristallines, décrites par Pedley (151) sont les suivantes :

a) *Réaction avec le réactif à l'iodure de cadmium de Marmé :*

— La nalorphine donne un précipité amorphe.

— La morphine donne un précipité gélatineux blanc qui cristallise rapidement en masses de fines aiguilles blanches.

b) *Réaction avec le réactif de Wagner à l'iode :*

— La nalorphine donne un précipité amorphe rouge brun qui ne cristallise pas alors que le précipité rouge brun donné dans les mêmes conditions par la morphine cristallise rapidement.

c) *Avec l'acide iodhydrique :*

— Nalorphine : on obtient des cristaux tabulaires.

— Morphine : on obtient des cristaux en longues aiguilles fines et pointues.

d) *Avec l'acide picrolonique :* (solution à 20 % dans l'éthanol).

La nalorphine précipite en masses homogènes qui, dans le cas de la morphine, se transforment au repos en amas d'aiguilles.

e) *Avec le réactif à l'iodure de cadmium-iodure mercurique :*

Ce réactif, reconnu par Lévi et coll. (112) comme très sensible de la morphine, donne avec la nalorphine un précipité lourd amorphe.

Nous pouvons aussi mentionner deux autres réactions permettant de différencier la nalorphine de la morphine :

a) *Spectre d'absorption dans l'infra-rouge* [Seagers et coll. (161)].

b) *Réaction de Cooper* (36) :

— à 1 ml d'une solution aqueuse à 1 % de nalorphine, on ajoute 10 gouttes d'une solution de nitrate cuivrique ammoniacale : la nalorphine donne une coloration bleue qui lentement devient grise, la morphine donne une coloration grise qui se développe immédiatement.

— Porter le tube dans l'eau bouillante pendant 1 mn : une coloration gris-jaune clair dénote la présence de la morphine tandis qu'une coloration gris-bleu avec un précipité blanc floconneux dénote la présence de la nalorphine.

CHAPITRE II

A. — PROPRIÉTÉS PHARMACOLOGIQUES

I. — Toxicité

Hart et coll. (83) avaient établi les doses toxiques de la nalorphine pour les souris :

— 491,5 mg/kg en injection intrapéritonéale.

— 703,8 mg/kg en injection sous-cutanée.

Unna (186) trouvait que le DL 50 chez les souris est de :

— 670 mg/kg en injection sous-cutanée.

Les doses toxiques provoquent chez les souris des convulsions [Hart et coll. (83)] et la mort survient par arrêt respiratoire [Unna (186)]. Chez les singes, Irwin et coll. (93) notaient les tremblements et les convulsions cloniques périodiques, puis la mort par collapsus cardiovasculaire et arrêt respiratoire simultanés.

II. — Action sur le système nerveux central

1. ACTION ANALGÉSIQUE :

La nalorphine n'a pas montré de propriétés analgésiques significatives chez les animaux [Smith et coll. (170), Unna (186), Winter et coll. (200), Woods (202)] sauf chez les rats où, d'après Hart et coll. (83) son action analgésique est aussi puissante que celle de la morphine.

Chez l'homme, la nalorphine manifeste une analgésie significative [Cappe et coll. (27), Deligné (43), Isbell (97)] et même forte [Beecher et coll. (14), Keats et coll. (107), Lasagna et coll. (111)].

2. ACTION SUR LA RESPIRATION :

Ce fut Unna (186) qui, en 1943, avait observé le premier que la nalorphine ne provoque pas de ralentissement du rythme respiratoire ni chez le chien, ni chez le lapin. Cette constatation fut confirmée en 1954 par Winter et coll. (200) chez le chien, mais fut mise en doute par Deavers

et coll. (40) qui estimaient au contraire que la nalorphine produit une légère dépression respiratoire chez cette espèce animale.

Chez l'homme, la nalorphine est un dépresseur respiratoire. Toutefois, à doses égales cette dépression respiratoire est beaucoup plus faible que celle provoquée par la morphine et ses dérivés [Eckenhoff et coll. (56), Foldès et coll. (61), Fraser (63), Fraser et coll. (64), Isbell (95), Keats et coll. (105), Lasagna et coll. (111), Tenny et coll. (181)]. Cependant il semble que par voie rectale, la nalorphine ne manifeste pas de propriétés dépressives [Deligné (43)].

3. ACTION SUR LA CIRCULATION :

— Chez le chien, la nalorphine est hypotensive [Huggins et coll. (90)].

— Chez l'homme il se produit une augmentation initiale de la pression sanguine suivie par une baisse [Fraser et coll. (64), Isbell (96), Lasagna et coll. (111), Wikler et coll. (196)].

4. ACTION SUR LE TRACTUS INTESTINAL :

Beal et coll. (11) démontraient que la nalorphine diminue la motilité gastro-intestinale chez l'homme. Les contractions de l'intestin isolé des rats normaux et des rats intoxiqués chroniques (tolérants) à la morphine et des cobayes, causées par la nicotine, la pilocarpine, le baryum et l'histamine sont complètement inhibées par la nalorphine [Mattila (118)].

5. EFFETS SUBJECTIFS DE LA NALORPHINE :

Selon Fraser et coll. (64), l'injection sous-cutanée des doses aussi faibles que 3 mg de nalorphine, provoque des effets subjectifs se traduisant par l'étourdissement, suivi par un léger assoupissement, une diminution de la température rectale et un myosis modéré.

La dose s'étalant entre 5 et 10 mg, produit les signes subjectifs ci-dessus avec en plus des tremblements, de la sensation de chaleur et de froid, de la difficulté de parole, des nausées, de la sueur et quelquefois des vomissements [Eckenhoff et coll. (56), Isbell (95), Lasagna et coll. (111)].

Avec des doses supérieures à 10 mg, les effets subjectifs ci-dessus s'accroissent considérablement, il y a en plus de l'euphorie et des hallucinations [Fraser et coll. (64), Huggins et coll. (92), Isbell (95), Keats et coll. (106), Lasagna et coll. (111), Wikler (194), Wikler et coll. (196)].

III. — Nalorphine et accoutumance

Selon Deligné (43) et Isbell (95), la nalorphine n'engendre pas de toxicomanie.

IV. — Nalorphine, antagoniste de la morphine

1. CONTRE L'ANALGÉSIE INDUITE PAR LA MORPHINE :

L'analgésie produite par la morphine est abolie ou prévenue par la nalorphine, chez les souris [Unna (186)] et chez les rats [Costa et coll. (37), Hart et coll. (83), Smith et coll. (170), Unna (186), Winter et coll. (200)]. Mais chez l'homme, d'après Cappe et coll. (26), il serait possible par un choix judicieux des doses respectives de la morphine et de la nalorphine de garder l'effet analgésique tout en supprimant certaines autres actions de la morphine tel que l'effet déprimeur respiratoire.

2. CONTRE LA DÉPRESSION RESPIRATOIRE DE LA MORPHINE :

C'est probablement sur ce point que les recherches ont été les plus nombreuses, d'une part en raison de la netteté particulière de l'antagonisme morphine/nalorphine, d'autre part en vue d'applications cliniques éventuelles, puisque la principale action toxique de la morphine s'exerce au niveau du centre respiratoire [Delaveau (42)].

Les travaux sur les rats [Costa et coll. (37), Smith et coll. (170)], sur les lapins [Hart (81) (82), Hart et coll. (83), Hazard (84), Hazard et coll. (85), Unna (186)], sur les chiens [Smith et coll. (170)] et sur les singes [Irwin et coll. (93)] avaient démontré que la nalorphine prévient ou abolit la dépression respiratoire induite par la morphine.

Cet antagonisme a été confirmé chez l'homme par plusieurs auteurs [Adriani et coll. (5), Cappe et coll. (27), Costa et coll. (37), Dulfano et coll. (49), Eckenhoff et coll. (53) (54) (56), Marx et coll. (117), Orton et coll. (142), Papadopoulos et coll. (147), Salomon et coll. (158)].

3. CONTRE D'AUTRES ACTIONS DE LA MORPHINE :

La nalorphine supprime le collapsus vasomoteur que la morphine produit parfois [Cappe et coll. (27)]. Elle s'oppose aussi à la morphine au niveau du tractus intestinal [Beal et coll. (11), Hart et coll. (83)] mais son administration au préalable ne fait que diminuer les effets de la morphine [Hart et coll. (83)]. Elle prévient et abolit l'action hyperglycémiant de la morphine chez le lapin [Keith et coll. (108), Zauder (208)], antagonise complètement son action antidiurétique chez les rats [Giarmen et coll. (72), Winter et coll. (198) (199)].

La narcose produite par la morphine chez les rats [Orahovats et coll. (140)], chez les chiens [Unna (186)], chez les singes [Irwin et coll. (93)] est complètement empêchée ou antagonisée, tandis que chez l'homme, on assiste seulement à une faible action antagoniste [Adriani et coll. (5), Dulfano et coll. (49), Eckenhoff et coll. (53) (54) (56), Marx et coll. (117)].

D'autres actions suivantes produites par la morphine sont contrebalancées par la nalorphine :

— L'hypotension chez le chien [Haggart et coll. (80), Orahovats et coll. (140), Unna (186)], chez l'homme [Adriani et coll. (5), Dulfano et coll. (49), Eckenhoff et coll. (53) (54) (56), Marx et coll. (117)].

— L'hypothermie et le myosis chez le chien [Smith et coll. (170)].

— Les spasmes biliaires [Schapiro et coll. (159)].

— La réduction de la consommation d'O₂ chez l'homme [Pontius et coll. (154)].

Enfin, administrée après la morphine, la nalorphine accélère l'excrétion urinaire de celle-ci [Achor et coll. (3)], réduit sa concentration dans le foie et les reins [Achor et coll. (2)] chez les souris, mais ne semble pas bloquer la N-déméthylation de la morphine chez les rats [March et coll. (115)].

V. — Nalorphine antagoniste des dérivés de la morphine

La nalorphine s'est montrée antagoniste :

— du Dilaudid chez le chien [Huggins et coll. (89) (90)], chez l'homme [Chase et coll. (33), Eckenhoff et coll. (56) (57), Gruber et coll. (78)].

— de la codéine :

— chez les souris [Miller et coll. (122)] ;

— chez l'homme [Huggins et coll. (89) (91), Salomon et coll. (158)] ;

— chez les chiens [Huggins et coll. (91)] ;

— de la norcodéine chez les souris [Miller et coll. (122)] ;

— du Pantopon [Eckenhoff et coll. (56)] ;

— de l'héroïne chez l'homme [Strober (176), Wikler et coll. (195) (196)] ;

— du Métopon :

— chez les chiens [Huggins et coll. (89) (91)] ;

— chez l'homme [Eckenhoff et coll. (55)].

VI. — Nalorphine antagoniste d'autres dérivés stupéfiants

La nalorphine combat la dépression respiratoire causée par :

— le méthadone chez l'homme [Eckenhoff et coll. (56), Fraser et coll. (65)], chez le chien [Huggins et coll. (89) (91)], chez le rat [Costa et coll. (37), Smith et coll. (170)] et chez le singe [Irwin et coll. (94)] ;

— l'isométhadone chez le rat [Smith et coll. (170), Winter et coll. (200)], et chez le singe [Gruber et coll. (78)] ;

— la mépéridine chez l'homme [Adriani et coll. (5), Bodman (19), Eckenhoff et coll. (53) (54) (56) (57), Foldés et coll. (61), Paterson et coll. (150), Radoff et coll. (155), Salomon et coll. (158)], chez le chien [Winter et coll. (200)], chez le rat [Costa et coll. (37), Smith et coll. (170)] et chez le lapin [Winter et coll. (200)] ;

— le kétobimédone chez le singe [Irwin et coll. (94)] ;

— l'héptazone et l'acétyl dl méthadol chez le rat [Smith et coll. (170)] ;

— le lévorphane [Eckenhoff et coll. (55)] ;

— du Dromorane :

— chez l'homme [Bornstein et coll. (20), Chase et coll. (33), Domino et coll. (46), Gruber et coll. (78)] ;

— chez le singe [Irwin et coll. (94)] ;

— l'alphaprodine [Dripps (48), Eckenhoff et coll. (55), Foldés et coll. (61), Salomon et coll. (158)].

— Plusieurs auteurs rapportaient que l'action analgésique de la mépéridine [Smith et coll. (170), Winter et coll. (200)], de l'alphaprodine [Winter et coll. (200)], de la méthadone [Smith et coll. (170)], de l'isométhadone [Smith et coll. (170), Winter et coll. (200)], de l'héptazone [Smith et coll. (170)] et de l'acétyl dl méthadol [Smith et coll. (170), Winter et coll. (200)] est aussi antagonisée par la nalorphine.

— L'antagonisme nalorphine-drogues narcotiques, en ce qui concerne la dépression respiratoire, n'est efficace que lorsque cette dépression est suffisamment grave, sinon, elle sera déprimée encore plus, par la nalorphine [Fraser (63), Huggins et coll. (92)]. D'autre part, dans le cas d'intoxication par les narcotiques, où les signes de convulsions sont prédominantes, la Nalorphine est sans effet [Koppányi et coll. (109), Winter et coll. (197)].

VII. — Nalorphine et barbituriques

Selon Gruber (77) chez les chiens, et Eckenhoff et coll. (56) chez l'homme, la nalorphine échoue dans l'antagonisme de la dépression respiratoire causée par le sécobarbital. Mais l'emploi de hautes doses de nalorphine (30 mg/kg I. V.) est efficace pour combattre la dépression respiratoire des chiens [Belford et coll. (15), Vivante et coll. (187) (188) (189)] et de l'homme [Dulfano et coll. (49)] endormis au Pentothal. Le résultat de Dulfano et coll. (49) chez l'homme est tout à fait le contraire de celui de Eckenhoff et coll. (53) (54) (56), de Adriani et coll. (5) et de Salomon et coll. (158). Cette divergence de résultats semble être due à la différence de technique expérimentale [Woods (202)].

VIII. — Nalorphine et accoutumance à la morphine et aux autres drogues narcotiques

Chez les chiens [Carter et coll. (29), Kaymackalan et coll. (103), Wikler et coll. (196)], chez les singes [Cappe et coll. (26), Irwin et coll. (94)], chez les rats [Kaymackalan et coll. (103)] qui sont accoutumés à la morphine ou à ses congénères, l'administration de la nalorphine provoque la précipitation du « syndrome d'abstinence aiguë ». Plusieurs auteurs retrouvent ce résultat chez des hommes [Deligné (43), Isbell (96), Isbell et coll. (98) (99), Wikler et coll. (195) (196)].

D'autre part, il semble que, aussi bien chez l'homme [Wikler et coll. (195)] que chez le chien [Wikler et coll. (195) (196)] la nalorphine intensifie le syndrome d'abstinence.

IX. — Mécanisme de l'antagonisme

Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer le mécanisme de l'antagonisme nalorphine-drogues narcotiques.

L'une d'elles, préconisée par Shaw et coll. (166), (167), repose sur l'action anti-cholinestérasique de la nalorphine [Blohm et coll. (18)] et ne semble pas recueillir beaucoup de suffrages, car la physostigmine, un puissant anticholinestérasique n'antagonise pas la morphine.

L'hypothèse qui paraît généralement acceptée, est celle qui fait intervenir le phénomène de compétition entre les drogues narcotiques et leur antagoniste au niveau des sites récepteurs [Beckett et coll. (13), Delaveau (42), Lasagna (110), Miller et coll. (124), Mulé et coll. (136), Radouco-Thomas (156), Seevers (162), Seevers et coll. (163), Winter et coll. (197) (200)].

Cependant Beckett et coll. (13), tout en admettant qu'il y a compétition entre nalorphine et drogues narcotiques au niveau des sites récepteurs, pensaient que l'antagonisme de l'action analgésique des narcotiques, est due à une excitation centrale provoquée par la nalorphine.

B. — EMPLOI DE LA NALORPHINE

La nalorphine est utilisée en thérapeutique :

— Dans tous les cas où la dépression respiratoire est causée par la morphine ou des composés morphinomimétiques [Deligné (44), Delaveau (42), Huggins et coll. (92)].

— en obstétrique, en injection ombilicale pour combattre la dépression respiratoire chez le nouveau-né, causée par l'administration à la mère de la morphine ou ses analogues pendant la parturition [Deligné (44), Eckenhoff et coll. (57), Fraser (63), Greene (74), Snyder (172) (173)].

— Pour détecter les morphinomanes [Carter et coll. (29), Fraser (63), Huggins et coll. (92), Terry et coll. (182)] et pour déterminer les effets stupéfiants des drogues [Isbell (96)].

Cependant, elle est contre-indiquée :

— Dans tous les cas où la dépression respiratoire n'est pas causée par la morphine ou ses analogues et dans le cas où la dépression respiratoire causée par ces drogues n'est pas significative [Fraser (63)].

— Chez les morphinomanes [Deligné (43) (44)].

CHAPITRE III

MÉTABOLISME DE LA NALORPHINE

Peu de travaux ont été faits pour élucider le mécanisme métabolique de la nalorphine. Cet apparent désintéressement trouve sa cause sans doute, dans le fait que la nalorphine et la morphine sont étroitement semblables par leur constitution chimique. La seule différence réside dans la présence du groupement allyl sur l'azote dans le cas de la nalorphine, au lieu du groupement méthyl comme dans le cas de la morphine. Or, cette différence ne semble pas beaucoup influencer leur métabolisme car celui-ci se porte surtout sur le groupement —OH phénolique.

De nos jours, le métabolisme de la morphine est bien établi. En effet, ce fut René Fabre (59) qui, en 1924, avait mis en évidence le rôle du foie dans la négativité de la détection de la morphine, après perfusion d'un foie de lapin avec une solution à 1/1000 de chlorhydrate de morphine dans le liquide de Ringer. Cette observation fut depuis, confirmée par Bernheim et coll. (17), par Simonnet (169), et par Strominger et coll. (179), tant *in vivo* qu'*in vitro*.

Par la suite, les travaux chez l'homme [Elliott et coll. (58), Oberst (137) (138), Paerregaard (143)], chez les chiens [Cochin et coll. (35), Elliott et coll. (58), Gross (75), Gross et coll. (76), Mellett et coll. (120), Oberst (137) (138), Paerregaard (143), Paerregaard et coll. (146), Thompson et coll. (183)] ; chez les singes [Mellett et coll. (120) (121)] ; chez les rats [March et coll. (115)] ont permis de préciser l'élimination urinaire de la morphine à la fois sous forme libre et sous forme conjuguée. La nature de la morphine conjuguée fut connue comme étant un « 3-monoglycuronide », d'une part par les travaux de Seibert et coll. (166) et de Woods (203) chez le chien, et d'autre part par les travaux de Fujimoto et coll. (69) et de Woods et coll. (205) chez l'homme. Le mécanisme de cette conjugaison qui se fait par un système enzymatique microsomique du foie a été rapporté par Axelrod et coll. (8) et par Takemori (178).

A côté de la conjugaison, le métabolisme de la morphine embrasse aussi la déméthylation et l'oxydation.

La déméthylation se fait par le système enzymatique microsomique du foie [Axelrod (6), Tekemori et coll. (180)]. La preuve en est faite, d'une

part par la présence de normorphine dans le cerveau [Milthers (124) (125)] et dans les urines [Misra et coll. (129)] des rats traités avec la morphine, et d'autre part, par la présence de $^{14}\text{CO}_2$ dans l'air expiré des chiens et de l'homme [Elliott et coll. (58), March et coll. (115)], des singes et des chiens [Mellett et coll. (120)] traités à la morphine marquée au carbone du $-\text{NCH}_3$.

Enfin l'oxydation de la morphine donnant naissance à la pseudomorphine a été prouvée *in vitro* par Abood et coll. (1) et par Hosoya et coll. (87) et *in vivo* par Misra et coll. (129).

Ainsi la biotransformation de la morphine passe par trois étapes : la conjugaison, la déméthylation et l'oxydation.

Nous basant sur ce plan, et à l'aide des travaux connus jusqu'à ce jour, nous essaierons d'établir le métabolisme de la nalorphine.

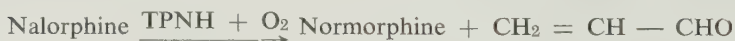
I. — La déalkylation

Axelrod et coll. (7), en incubant la nalorphine avec les microsomes et la fraction soluble surnageante du foie du rat mâle, ont pu caractériser la normorphine par chromatographie dans le milieu réactionnel. De même, chez les rats mâles, traités à la nalorphine, par voie intraveineuse, la présence de normorphine dans le cerveau a été établie [Milthers (124) (125)].

Ainsi la déalkylation de la nalorphine paraît hors de doute. Elle a lieu dans le foie, sous l'influence d'un système enzymatique microsomique commun à celui qui déméthyle la morphine, en présence de TPNH et d' O_2 [Axelrod (6), Cochin et coll. (34), Takemori et coll. (180)].

Le mécanisme de la réaction est une déalkylation oxydante donnant naissance à l'acroléine pour la chaîne allylée et pour le reste de la molécule à la normorphine [Takemori et coll. (180)].

Beckett et coll. (13) avaient proposé le schéma réactionnel suivant :



L'antagonisme nalorphine/morphine, admis sur le plan pharmacologique, en ce qui concerne la dépression respiratoire, se manifeste aussi sur le plan métabolique. En effet, selon Axelrod et coll. (7) qui avaient effectué leurs expériences sur des préparations microsomiques du foie de rat, la nalorphine inhibe la N-déméthylation de la morphine.

II. — L'oxydation

Hosoya et coll. (87) rapportaient que 200 mg de foie de rat, sont capables de transformer 30 % de morphine en pseudomorphine, en présence de

cytochrome C en quantité suffisante. Ils rapportaient que cette oxydation qui a lieu dans les mitochondries des cellules hépatiques se fait aussi sur la nalorphine.

III. — La conjugaison

En 1953, Seibert et coll. (164) avaient entrepris l'étude de la conjugaison de la nalorphine *in vitro*, par les tranches de foie de chiens. Ils trouvaient qu'au bout de deux heures d'incubation, environ 75 % de la nalorphine est conjuguée par 300 g de tranches de foie. Cette étude fut refaite *in vivo* par Muehlenbeck et coll. (130) sur les chiens en 1952, et par Woods et coll. (207) sur les rats et les chiens en 1957. Ces auteurs avaient rapporté que l'élimination urinaire de la nalorphine s'établit comme suit : 1 à 4 % sous forme libre et 42 à 56 % sous forme conjuguée.

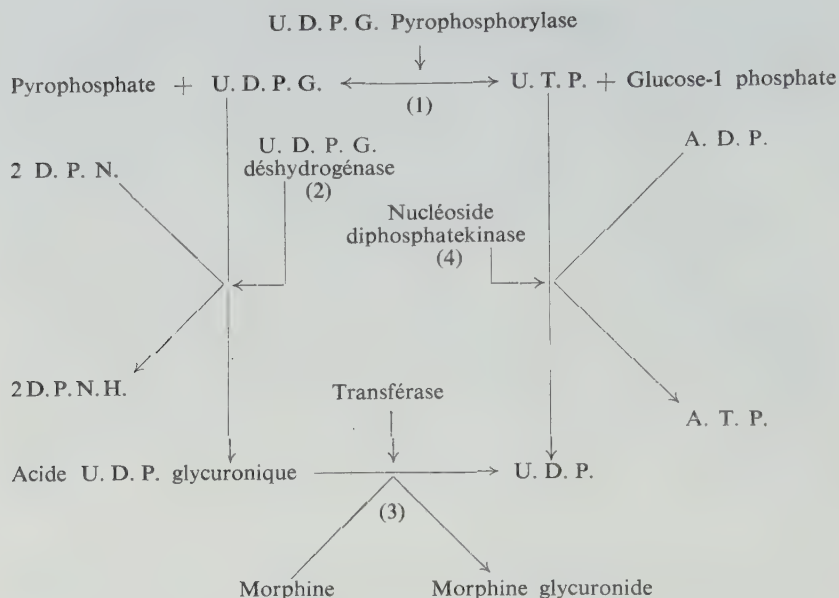
Les investigations de Axelrod et coll. (8) en 1960 avaient permis de connaître d'une manière indirecte, la nature chimique du métabolite conjugué qui est probablement un glucuronide. Ces auteurs avaient prouvé, d'autre part, qu'un système enzymatique microsomique du foie, transfère l'acide glycuronique de l'acide U. D. P. glycuronique sur le groupement phénol des drogues narcotiques, donnant naissance au « 3 monoglycuro-nide » confirmant ainsi les travaux de Fujimoto et coll. (69) (70) et de Woods (203).

Plusieurs auteurs rapportaient que ce processus métabolique survient aussi avec d'autres phénols étrangers [Axelrod et coll. (10), Beck et coll. (12), Dutton et coll. (51), Isselbacher et coll. (100), Schmid et coll. (161), Smith et coll. (171), Storey et coll. (174)], avec des acides carboxyliques [Dutton (50)] et avec des amines [Axelrod et coll. (9)].

La formation de l'acide U. D. P. glycuronique est catalysée par un enzyme qui oxyde U. D. P. glucose en présence de D. P. N. [Beck et coll. (12), Strominger et coll. (177), Takemori (178)]. D'autre part, l'acide U. D. P. glycuronique a pu être isolé à partir des cellules hépatiques broyées [Cabib et coll. (24), Caputto et coll. (28), Dutton et coll. (52), Park (148) (149), Storey et coll. (174)].

Ainsi la synthèse des glycuronides des drogues narcotiques, semble être à présent connue. Cependant le mécanisme complet de la réaction, n'a été établi que récemment d'une part par Takemori (178) pour la morphine, et d'autre part par Beck et coll. (12) pour le menthol.

Nous reproduisons ci-dessous le schéma de la synthèse des glycuronides de la morphine, selon Takemori (178), schéma qui fait intervenir tous les enzymes responsables.



Les enzymes suivants catalysent les réactions successives [Takemori (178)] :

— Réaction 1 : par Uridine-diphospho-glucose pyrophosphorylase [Peter- sen et coll. (152)].

— Réaction 2 : par Uridine-diphospho-glucose déshydrogénase [Stro- minger et coll. (177)].

— Réaction 3 : par transférase [Dutton et coll. (51), Storey et coll. (174), Strominger et coll. (177)].

— Réaction 4 : par Nucléoside diphosphate kinase [Berg et coll. (16)].

En étudiant l'influence de l'administration chronique et de l'administra- tion unique de la morphine sur l'activité enzymatique responsable de la conjugaison de la morphine chez le rat, Takemori (178) a constaté que, dans les deux cas, l'activité de U. D. P. G. déshydrogénase augmente et celle de la transférase diminue alors que l'activité des deux autres enzymes n'est que faiblement altérée.

Entre la morphine et la nalorphine, il n'y a pas de différence de vitesse de conjugaison ; seule la différence dans la vitesse de fixation dans le foie existe : la nalorphine y est fixée plus vite que la morphine [Seibert et coll. (164)]. Mais pour Woods et coll. (207), la nalorphine est conjuguée plus rapidement et plus complètement que la morphine chez les chiens.

IV. — La distribution

Hug et coll. (88), d'une part, et Woods (201), d'autre part, avaient étudié la distribution comparative entre la morphine et la nalorphine dans le cerveau chez les chiens. Les résultats obtenus par Woods (201) étaient les suivants :

— La nalorphine atteint plus vite sa concentration maximum dans le cerveau que la morphine : ce maximum étant trois fois supérieur à celui de la morphine.

— La nalorphine disparaît plus vite du cerveau que la morphine ; par exemple, 8 heures après l'administration de la même dose de ces deux drogues, la concentration de la nalorphine est de 0,2 $\mu\text{g/g}$ de tissu et celle de la morphine est de 3,8 $\mu\text{g/g}$.

Le premier point s'expliquerait par une plus grande vitesse de pénétration de la nalorphine dans les tissus cérébraux [Woods (201)]. Le deuxième fait serait dû à une distribution extracellulaire de la nalorphine car la morphine est à la fois extracellulaire et intracellulaire [Seevers (162), Seevers et coll. (163)].

Dans le plasma des chiens [Woods et coll. (207), Muehlenbeck et coll. (130)] la concentration de la nalorphine libre est de 4,2 à 4,9 $\mu\text{g/ml}$, celle de la nalorphine conjuguée est de 42 à 56 % de la dose totale injectée. La nalorphine libre et la nalorphine conjuguée ne seront plus décelables dans le plasma respectivement 5 heures et 7 heures après l'injection.

Cochin et coll. (35) avaient rapporté que la concentration de la nalorphine libre dans le plasma est inférieure à celle de la morphine libre et inversement pour les formes conjuguées. Cela serait dû à une plus rapide et plus complète conjugaison de la nalorphine comparée à la morphine [Woods et coll. (207)].

Ce furent Woods et coll. (207) qui avaient entrepris l'étude complète de la distribution de la nalorphine chez les chiens. Nous reproduisons ci-dessous le tableau rapporté par eux dans leurs travaux :

Tissus ou liquides biologiques	Conc. de la nalorphine en $\mu\text{g/g}$ ou ml de tissus ou liquides biologiques			
	90 mn		4 h	
	Libre	Conjuguée	Libre	Conjuguée
Vésicule biliaire	6	450	12	1.020
Reins	18	34	< 5	< 5
Rate	20	0	< 5	0
Poumons	5	10	10	< 5
Foie	5	11	< 5	< 5
Muscle strié	5	< 5	< 5	< 5
Muscle lisse	12	0	< 5	0
Pancréas	16	0		
Jéjunum	5	25	< 5	96
Côlon	10	< 5	< 5	35
Sang	< 5	15	< 5	5

Distribution de la nalorphine libre et conjuguée chez deux chiens, chacun 90 mn et 4 h après administration sous-cutanée de 30 mg/kg de nalorphine. [Wood et Coll. (207)].

De tous les organes, la vésicule biliaire est de loin le plus riche en nalorphine conjuguée, dont la concentration y est toutefois plus faible que celle de la morphine conjuguée, chez le chien [Woods (204)].

V. — L'élimination

D'après les travaux sur les chiens de Muehlenbeck et coll. (130) et de Woods et coll. (207), la nalorphine est essentiellement éliminée par les urines à la fois sous forme libre (2,5 %) et sous forme conjuguée (48 %). Alors que la nalorphine libre est complètement éliminée au bout de 4 heures après injection, la nalorphine conjuguée ne le sera qu'au bout de 24 heures [Woods et coll. (207)]. Selon les auteurs cités ci-dessus, la quantité de la nalorphine libre totale dans les urines est seulement 1/6 de celle de la morphine libre.

Le taux de la nalorphine totale éliminée, chez les chiens, est environ 60 % de la dose totale administrée, taux qui est plus faible que celui de la morphine [Woods et coll. (207)], lequel étant de 80 % [Mellett et coll. (121)]. Il semble donc que chez le chien, la nalorphine subit d'autres altérations chimiques secondaires [Woods et coll. (207)].

DEUXIÈME PARTIE

EXPOSÉ DES TRAVAUX ANTÉRIEURS

Bien que la nalorphine ait été connue depuis 1942, date de sa synthèse par McCawley et coll. (119), elle n'avait été l'objet que de peu de travaux d'ordre toxicologique, alors que ceux d'ordre pharmacologique en vue d'applications cliniques sont nombreux.

Le but de notre travail est d'ordre toxicologique, en essayant de caractériser et de doser par des réactions et méthodes déjà mises au point, la nalorphine dans les milieux biologiques et dans les tissus.

Dans ce chapitre, nous nous proposons de rassembler tous les travaux antérieurs concernant la nalorphine au point de vue de son extraction, de sa caractérisation et de son dosage.

I. — Extraction

1. — EXTRACTION DE LA NALORPHINE LIBRE :

La nalorphine, alcaloïde semi-synthétique du groupe de la morphine peut être isolée des liquides biologiques et des viscères par la méthode classique de Stas-Otto-Ogier. Cette méthode qui est employée pour notre travail, a l'inconvénient de nécessiter le processus préliminaire fastidieux de purification et d'isolement.

Ainsi, Milthers (126) avait proposé une déprotéinisation par le chlorure d'uranyle car l'acide trichloracétique peut engendrer des pertes [Milthers (128)]. L'isolement de la nalorphine libre se fait ensuite en milieu alcalin à pH 8,4 (CO_3HNa), à l'aide du mélange chloroforme-isopropanol dans le rapport 3/1. L'extraction par ce mélange a aussi été préconisée par d'autres auteurs pour la morphine [Milthers (126) (127) (128), Paerregaard (145), Thompsett (184) (185)]. Le mélange extractif est évaporé à sec et le résidu est repris par HCl N .

Woods et coll. (207) avaient étudié le sort et la distribution de la nalorphine chez les chiens et les rats, en appliquant la méthode de déprotéini-

sation et d'isolement décrite par Woods et coll. (205), pour la morphine. Cette méthode varie suivant les échantillons à analyser :

— Pour le plasma, la déprotéinisation se fait tout simplement à l'aide de 20 % de son poids d'acide trichloracétique sur le plasma dilué par un volume égal d'eau distillée.

— Pour les urines :

— D'abord l'urine doit être diluée, proportionnellement à sa densité :

- Si $d = 1,030$: la dilution déprotéinisante est au moins de 1/20 à l'aide d'une solution à 6,7 % d'acide trichloracétique.
- Si $d > 1,030$: dilution plus forte.
- Si $d < 1,030$: dilution moindre.

— Ensuite l'urine convenablement diluée est additionnée de 0,5 ml d'une solution aqueuse à 0,1 % de duponol, et alcalinisée par du bicarbonate de sodium puis agitée 3 fois, chaque fois avec 20 ml d'acétate d'éthyle contenant 2,5 % d'éthanol. Et chaque fois, la phase organique est recueillie et agitée avec les mêmes 5 ml de HCl 0,5 N.

— Pour les tissus et autres liquides biologiques :

- 1,5 g de tissus finement broyés sont homogénéisés avec 13,5 ml de HCl à 0,5 N.
- 1 ml de bile ou de liquide céphalo-rachidien est dilué à 15 ml avec HCl 0,1 N.
- 1,5 ml de sang total est dilué à 15 ml avec une solution de NaHSO_3 à 40 % et 12 ml de HCl à 0,1 N.

10 ml d'homogénat de tissus ou de bile dilué ou de liquide céphalo-rachidien dilué ou de sang total dilué sont agités avec 5 ml de solution d'acide trichloracétique à 20 %. Après centrifugation 10 ml de surnageant sont mélangés avec 2 g de NaCO_3H et 0,5 ml de solution aqueuse de duponol et le mélange est agité avec l'acétate d'éthyle contenant 2,5 % d'éthanol selon le procédé ci-dessus.

— Pour les fèces :

Une prise d'essai de 4 g de fèces est agitée avec 32 ml de HCl 0,5 N et 4 ml de solution à 4 % de NaHSO_3 pendant 90 mn et centrifugée pendant 60 mn. Le surnageant est dilué avec 2 volumes de solution d'acide trichloracétique à 6,7 % et filtré. 10 ml de filtrat est soumis à l'extraction par l'acétate d'éthyle contenant 2,5 % d'éthanol comme il a été dit plus haut pour les urines.

S'inspirant à la fois de la méthode de Woods et coll. (205) et du travail de Guyot (79), M. le Professeur Chambon et coll. (32) avaient établi une

nouvelle technique d'extraction et d'isolement de la morphine des liquides biologiques et des tissus. Cette méthode sera intégralement suivie par nous pour l'étude de la nalorphine.

2. — EXTRACTION DE LA NALORPHINE LIÉE :

Woods et coll. (207) pour la nalorphine d'une part, M. le Professeur Chambon et coll. (32) pour la morphine d'autre part, avaient appliqué la méthode de Woods et coll. (205) pour hydrolyser le produit lié. Cette hydrolyse se fait à l'autoclave à 120° C pendant 30 mn et en milieu acide (1/10° HCl concentré), sur 5 ml de filtrat trichloracétique.

L'hydrolysate obtenu est ramené à un volume de 10 ml et filtré par une solution aqueuse d'acide trichloracétique dont la concentration diffère selon l'origine de l'hydrolysate : l'hydrolysate du plasma ou des tissus est dilué à 10 ml avec une solution aqueuse d'acide trichloracétique à 6,7 %, tandis que celui des urines, de la bile ou des fèces l'est avec une solution à 20 %. L'extraction et l'isolement de la nalorphine libérée se fait selon la technique décrite dans le paragraphe de l'isolement de la nalorphine libre des urines.

La technique de M. le Professeur Chambon et coll. (32), que nous décrivons plus loin, diffère de celle de Woods et coll. (205) dans l'extraction et l'isolement de la nalorphine libérée.

Pour Milthers (126), l'hydrolyse se fait à l'autoclave à 120° C pendant 30 mn en milieu acide (1/10° HCl concentré), sur le filtrat provenant de la déprotéinisation par le chlorure d'uranyle.

II. — Caractérisation

Les quelques réactions colorées et microcristallines de la nalorphine sont mentionnées dans le paragraphe « Réactions colorées » du chapitre II, de la Troisième Partie.

III. — Dosage

Plusieurs méthodes ont été avancées pour l'estimation de la nalorphine.

1. POLAROGRAPHIE :

La méthode polarographique, initialement employée pour l'estimation de la morphine par Milthers (126) (128), Paerregaard (144) a été appliquée au dosage de la nalorphine et de la normorphine par Milthers (128). En effet, en faisant agir du nitrite de potassium sur ces drogues en milieu acide (HCl) ces auteurs avaient obtenu des dérivés pouvant être dosés par polarographie et qui ont été identifiés comme des nitroso-dérivés par

Milthers (128) et Paerregaard (144), alors que Lund (114) et Rasmussen et coll. (157) les identifiaient aux nitro-dérivés.

Cette méthode très élégante, de sensibilité satisfaisante, manque cependant de spécificité car tous les phénols ayant le groupement hydroxyl libre en ortho, peuvent être nitrés, donc dosés par polarographie [Milthers (126), Paerregaard (144)].

2. MÉTHODES COLORIMÉTRIQUES :

Etant donnée la similitude de constitution chimique entre la morphine et la nalorphine, toutes les méthodes de dosage de la morphine mettant à profit sa fonction phénol, sont applicables à l'estimation de la nalorphine. De telles méthodes, malheureusement de faible sensibilité, car elles permettent seulement de doser de 10 à 50 $\mu\text{g/ml}$ de morphine, ont été étudiées par plusieurs auteurs [Adamson et coll. (4), Brodie et coll. (22), Cahen et coll. (25), Fujimoto et coll. (71), Kaiser et coll. (104), Oberst (139), Oram (141), Thompson (185), Woods et coll. (205)].

Parmi ces méthodes, celle de Woods et coll. (205) se prête au dosage de la morphine à la concentration de 3 $\mu\text{g/ml}$ de plasma, de 10 $\mu\text{g/ml}$ d'urines, et de 5 $\mu\text{g/g}$ de tissus avec des pourcentages de recouvrement respectivement de $95 \pm 10 \%$, $100 \pm 5 \%$ et $100 \pm 25 \%$. Cette méthode a été entièrement appliquée par Woods et coll. (207) au dosage de la nalorphine, et par M. le Professeur Chambon et coll. (32) au dosage de la morphine, après quelques modifications. C'est cette méthode de Woods et coll. modifiée qui sera employée pour le dosage de la nalorphine dans notre travail et décrite dans le chapitre « Travaux personnels ».

Il est à noter que l'ester p. nitrobenzoïque de morphine peut être soit réduit par le chlorure de titane suivant la méthode de Glazko et coll. (171) et l'amine obtenu, diazoté selon la méthode de Bratton et coll. (21) ; soit complexé par le pourpre de bromocrésol comme l'avaient décrit Woods et coll. (206).

3. SPECTRE D'ABSORPTION DANS L'ULTRA-VIOLET [Seagers et coll. (161)] :

Le spectre d'absorption ultra-violet de la solution aqueuse du chlorhydrate de nalorphine montre un maximum à 285 $m\mu$ et un minimum à 260 $m\mu$. L'addition d'un acide ne cause pratiquement pas de changement dans le spectre, mais l'alcali cause une augmentation considérable dans l'absorption et déplace le maximum à 298 $m\mu$ et le minimum à 278 $m\mu$. Ce spectre d'absorption ultra-violet est le même pour la nalorphine, la normorphine, la morphine et des composés relatifs à la morphine, car il est donné par le noyau phénanthrène qui est un groupement chromophore dans l'ultra-violet.

4. SPECTRE D'ABSORPTION DANS L'INFRA-ROUGE [Seagers et coll. (161)] :

Les spectres d'absorption dans l'infra-rouge du chlorhydrate de nalor-

phine et du chlorhydrate de morphine sont suffisamment différents pour permettre la détection de la nalorphine en présence de la morphine, car ils sont dus au groupement allyl. Ainsi le chlorhydrate de nalorphine montre des maxima à 9,70 μ , 10,04 μ , 10,20 μ , 10,42 μ , 10,56 μ , 10,90 μ , 11,06 μ , 11,37 μ qui ne sont pas donnés par la morphine.

TROISIÈME PARTIE

TRAVAUX PERSONNELS

Les travaux antérieurs, bien que peu nombreux, concernant le métabolisme de la nalorphine, nous avaient apporté un certain nombre de résultats que nous nous sommes proposés de vérifier.

Pour cela, nous avons effectué nos expériences sur deux chiens mâles pesant respectivement 23,500 kg et 14,300 kg.

Au premier chien, nous avons injecté par voie sous-cutanée une dose de 6,8 mg/kg de poids d'animal, de chlorhydrate de nalorphine, contenu dans des ampoules injectables.

Au second chien, nous avons injecté également par voie sous-cutanée, une dose de 10 mg par kg de poids d'animal, de chlorhydrate de nalorphine en solution aqueuse extemporanément préparée à partir du produit pur en poudre aimablement fourni par le laboratoire Clin-Byla.

Nous avons en plus observé le comportement des chiens après l'injection et avons noté les faits suivants :

Avant l'administration de la drogue, les chiens sont très vigilants. Ils aboient et s'agitent dans leur cage respective. Environ 35 mn après l'injection, aussi bien d'une dose de 6,8 mg/kg qu'une dose de 10 mg/kg, ils deviennent calmes en position allongée sur leurs pattes. La respiration ralentie, l'animal semble plongé dans un profond assoupissement. Cette attitude dure environ 2 h au bout desquelles l'animal redevient vigilant.

Notre observation, tout à fait superficielle, il est vrai, semble être en concordance avec celle décrite par Deavers et coll. (40), selon laquelle la nalorphine produit une légère dépression respiratoire chez les chiens.

Ces deux chiens sont sacrifiés par saignée à blanc, le premier huit heures, le second seize heures après l'injection de la solution du chlorhydrate de nalorphine.

Tous les viscères (la vésicule biliaire, le foie, les reins, la vessie, les intestins) et le sang sont prélevés et gardés au réfrigérateur. Les urines éliminées extérieurement en assez grand volume, n'ont pu être recueillies.

Avant d'effectuer nos analyses sur les viscères, nous nous sommes appli-

qués à nous familiariser avec la méthode de dosage adoptée, qui est celle de Woods et coll. (205), modifiée par M. le Professeur Chambon et coll. (32).

Courbe d'étalonnage :

Comme toutes les méthodes spectrophotométriques, la méthode de M. le Professeur Chambon nécessite l'établissement d'une courbe d'étalonnage représentant la densité optique en fonction de la concentration de la substance.

PRINCIPE DE LA MÉTHODE :

La nalorphine est estérifiée en milieu alcalin à l'aide du chlorure de p. nitro-benzoyle selon le procédé de Schotten-Baumann. L'ester obtenu est extrait par un solvant organique, le dichloro-1-2-éthane, puis complexé avec un colorant sulfonique : le méthylorange suivant le procédé de Brodie et Udenfriend. La fixation du colorant étant proportionnelle à la quantité d'ester, la libération finale du colorant par HCl N, permet l'estimation de l'intensité de coloration au spectrophotomètre à 5150 Å°.

MATÉRIEL :

- Ampoules à décantation d'une capacité environ de 30 ml à bouchons rodés.
- Flacons ampoules à bouchons rodés de 30 ml.
- Tubes de centrifugation.
- Petits entonnoirs.
- Coton hydrophyle desséché.

RÉACTIFS :

- 1-2-dichloréthane lavé, séché, redistillé Eb à 83,5°.
 - Réactif avec le chlorure de p. nitro-benzoyle : dissoudre dans un ballon jaugé propre et sec, 2 g de produit dans 100 ml de dichloréthane. Solution à préparer extemporanément.
 - Tampon borate pH 9
 - Acide borique 48 g.
 - NaOH 15 g.
 - Eau distillée Q. S. P. 1.000 ml.
 - Tampon phosphate pH 5
 - Phosphate disodique 3,5 g.
 - Phosphate monopotassique 132,7 g.
 - Eau distillée Q. S. P. 1.000 ml.
- Solution à conserver sur l'étuve pour éviter la recristallisation des sels.

— Solution d'acide borique 0,5 M

Acide borique 3,09 g.
Eau distillée Q. S. P. 100 ml.

— Réactif au méthylorange.

Dissoudre à chaud, 500 mg de méthylorange dans 100 ml d'eau distillée, puis filtrer à chaud. Agiter trois fois la solution obtenue refroidie avec V. E. de chloroforme pur et lavé. Avant l'usage, diluer 0,5 ml de cette solution avec V. E. de solution d'acide borique 0,5 M.

— HCl N et HCl N/2.

— Solution de NaOH à 43 %.

— Solution de sulfite acide de sodium à 40 %.

Nous avons préparé une solution de chlorhydrate de nalorphine, produit pur en poudre, dans l'eau distillée à la concentration de 10 mg/1.000 ml. Pour la bonne conservation de cette solution nous y avons ajouté 2 gouttes d'acide chlorhydrique concentré.

1 ml de cette solution contient 10 µg de chlorhydrate de nalorphine.

TECHNIQUE :

1. Verser dans chaque flacon-ampoule numéroté, propre et sec, successivement les réactifs suivants :

Numéro des flacons-ampoules	I	II	III	IV	V	VI	VII
Sol. de chlorhydrate de nalorphine	0 ml	0,25	0,50	0,75	1	2	3 ml
HCl N	5	4,75	4,50	4,25	4	3	2 ml
Sol. NaSO ₃ H	1	1	1	1	1	1	1 ml

2. Mélanger et neutraliser par quelques gouttes de NaOH à 43 %.

3. Puis rapidement, ajouter dans chaque ampoule 10 ml de réactif au chlorure de p. nitro-benzoyl dans le dichloréthane et 1 ml de solution de NaOH à 43 %.

4. Agiter les flacons-ampoules mécaniquement pendant 40 mn.

5. Transvaser avec soin le contenu de chaque flacon-ampoule respectivement dans des ampoules à décantation.

6. Rejeter la couche aqueuse superficielle.

7. Laver la phase organique par agitation pendant 1 mn avec 5 ml de tampon pH 9 et rejeter la phase aqueuse.

8. Laver de nouveau la phase organique par agitation pendant 1 mn avec 5 ml de tampon pH 5 et rejeter encore la phase aqueuse.

9. Ajouter dans chaque ampoule à décantation contenant la phase organique, 0,5 ml de solution diluée de méthylorange.

10. Agiter énergiquement à la main pendant 10 mn.

11. Séparer quantitativement la phase organique inférieure qui aura pu se teinter en jaune plus ou moins intense.

12. Centrifuger la phase organique pendant 5 mn à 5.000 tours/mn.

13. Eliminer par aspiration à l'aide du vide la couche aqueuse supérieure de méthylorange.

14. Filtrer la solution organique du complexe ester p. nitro-benzoïque de nalorphine-méthylorange, sur un fragment de coton hydrophyle desséché, destiné à éliminer complètement toutes traces de solution aqueuse.

15. Pipeter 5 ml de chaque phase organique et les mettre dans des flacons-ampoules respectifs.

16. Ajouter à chaque ampoule 4 ml de HCl N et agiter énergiquement pendant 5 mn.

17. Séparer quantitativement la phase aqueuse colorée de méthylorange.

18. Effectuer la lecture de la densité optique (D. O.) au spectrophotomètre à 5.150 Å° ou 515 mμ dans une cuve de 1 cm d'épaisseur.

Résultats :

— La valeur de la D. O. trouvée pour le témoin sans nalorphine est de 0,002.

— Les valeurs de la D. O. trouvée, dont on a soustrait la D. O. témoin, correspondent aux diverses concentrations en nalorphine base.

Conc. en nalorphine base	D. O.
2,25 μg	0,020
4,50 μg	0,039
6,75 μg	0,059
9,00 μg	0,079
18 μg	0,160
27 μg	0,237

— A l'aide de ces valeurs, nous traçons une courbe d'étalonnage en portant en ordonnées les concentrations en nalorphine base par ml et en abscisses la D. O.

Courbe d'étalonnage

Concentration de Nalorphine
base en μg par ml



à 515 $m\mu$
sous 1 cm d'épaisseur

REMARQUES :

Pour obtenir une courbe d'étalonnage correcte, les précautions suivantes sont à prendre :

- Bien rejeter quantitativement les tampons après chaque lavage.
 - Chaque fois, laver l'ampoule à décantation d'abord à l'eau ordinaire puis à l'eau distillée.
-

CHAPITRE 1

EXTRACTION ET DOSAGE DE LA NALORPHINE

A. — LA NALORPHINE LIBRE

Pour l'extraction de la nalorphine libre des liquides biologiques et des viscères, nous avons employé, d'une part la méthode de Stas-Otto-Ogier, légèrement modifiée, pour le premier chien, et d'autre part, pour le deuxième chien la méthode de Monsieur le Professeur Chambon sans hydrolyse.

I. — Méthode de Stas-Otto-Ogier [Chambon (30)]

1. — PRINCIPE :

Cette méthode consiste dans une macération dans l'alcool en milieu acide (acide tartrique) des viscères soigneusement broyés. Le filtrat extractif, soumis à l'évaporation sous vide, est purifié par traitement réitéré à l'alcool que l'on élimine chaque fois, par distillation sous vide. Le résidu, mis en suspension dans l'eau distillée, et l'ensemble vérifié exempt de traces d'alcool, est soumis à l'agitation d'abord avec l'éther de pétrole en milieu acide, pour éliminer les matières grasses, puis toujours en milieu acide, avec l'éther éthylique pour éliminer les acides organiques, les barbituriques et les glucosides éventuelles. L'alcaloïde libre est extrait de la phase aqueuse en milieu alcalin (NaCO_3H) par l'éther, puis par le chloroforme ou l'alcool amylique.

2. — MATÉRIEL :

— Sable lavé et calciné : Le sable est tamisé, puis lavé à l'eau chlorhydrique jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de dégagement de bulles de gaz. Ensuite, le sable est lavé à l'eau ordinaire jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de réaction acide au papier bleu de tournesol, puis à l'eau distillée. Enfin il est réparti dans des capsules de porcelaine et mis à calciner dans le four électrique pendant au moins deux heures.

— Ampoules à décantation.

— Presse à main.

— Appareil à distiller ordinaire, sous pression réduite.

3. — RÉACTIFS :

- Alcool éthylique à 95°.
- Alcool éthylique absolu.
- Ether de pétrole léger.
- Ether éthylique soigneusement débarrassé des peroxydes par traitement au sodium tréfilé.
- Chloroforme lavé à l'eau.
- Acide tartrique pulvérisé.

4. — TECHNIQUE :

a) *Macération extractive* :

— Broyer soigneusement une partie de viscères coupés en petits morceaux, dans un mortier avec du sable lavé et calciné.

— Ajouter de l'alcool à 95° pour avoir une bouillie homogène, puis acidifier à l'aide de l'acide tartrique finement pulvérisé.

— Homogénéiser et laisser macérer dans un flacon bouché, à la température du laboratoire pendant 48 heures, en agitant de temps en temps.

— Après le temps de macération, décanté la bouillie sur un filtre de papier, et presser le résidu fortement à la presse à main.

— Reprendre le résidu par de l'alcool à 95°, homogénéiser, acidifier à nouveau, s'il y a lieu, à l'aide de l'acide tartrique pulvérisé, puis filtrer et presser le résidu de filtration à la presse à main.

— Laver le papier filtre et la presse avec de l'alcool à 95° et réunir les alcools de lavage et les joindre au filtrat.

— Filtrer à nouveau si besoin est, la liqueur alcoolique en lavant toujours le filtre avec quelques ml d'alcool à 95°.

Remarques :

Pour les urines et la bile où la nalorphine n'est pas engagée dans les tissus ou cellules, la macération est inutile. On soumet tout de suite l'homogénat acide alcoolique des liquides biologiques aux phases suivantes de la méthode.

b) *Purification à l'alcool* :

L'appareil distillatoire étant en communication avec la trompe à eau, le ballon distillatoire chauffé au B. M. à 60°C.

— Faire tomber goutte à goutte le filtrat alcoolique précédent au fond du ballon, à l'aide d'une ampoule à brome dont la tige en verre passe par un trou percé dans le bouchon en caoutchouc du ballon.

— Quand tout le filtrat est évaporé, couper le vide et introduire dans le ballon par l'ampoule à brome 50 ml d'alcool absolu. Supprimer le vide et agiter fortement le ballon et filtrer. Laver le filtre avec quelques ml d'alcool absolu. Joindre l'alcool de lavage au filtrat.

— Evaporer à nouveau ce filtrat alcoolique comme ci-dessus. Renouveler l'opération d'élimination de protéines 2 fois au moins par l'alcool absolu (nous constatons que trois reprises par l'alcool absolu suffisent pour éliminer toutes traces de protéines).

Remarques :

— Dans notre travail, pour précipiter les protéines, nous avons employé directement l'alcool absolu au lieu de l'alcool à 95° d'abord puis l'alcool absolu ensuite comme l'avaient préconisé Stas-Otto-Ogier. Ceci parce que l'alcool absolu précipite mieux les protéines que l'alcool à 95°, nous permettant ainsi d'aller plus vite.

— L'évaporation du filtrat alcoolique provenant de la bile est retardée par la formation des mousses abondantes. Aussi, faut-il mener l'opération très lentement en ne faisant tomber la goutte suivante de filtrat alcoolique que lorsque la goutte précédente est complètement évaporée.

c) Elimination de l'alcool :

— Reprendre le résidu de la dernière évaporation de l'alcool absolu par 40 ml d'eau distillée.

— Réduire ce liquide à la moitié de son volume par distillation sous vide, pour être sûr d'avoir éliminé toutes traces d'alcool.

d) Purification par l'éther de pétrole :

— Verser le liquide obtenu dans une ampoule à décantation. Laver le ballon avec quelques ml d'eau distillée, et joindre l'eau de lavage au liquide contenu dans l'ampoule à décantation.

— Vérifier l'acidité de la liqueur à l'aide du papier de tournesol.

— Epuiser cette liqueur deux fois au moins en agitant avec soins pendant 5 mn, chaque fois avec 30 ml d'éther de pétrole.

— Chaque fois, éliminer la phase éthéro-pétrolique.

e) Purification par l'éther éthylique :

— Vérifier de nouveau l'acidité de la liqueur.

— Epuiser cette liqueur avec l'éther éthylique déperoxydé, en procédant comme pour l'extraction avec l'éther de pétrole.

f) Extraction de la nalorphine libre :

C'est ici qu'intervient essentiellement la modification de la méthode initiale de Stas-Otto-Ogier. En effet au lieu d'employer le chloroforme ou

l'alcool amylique pour l'extraction de l'alcaloïde base, nous avons essayé et adopté le mélange chloroforme-alcool comme solvant extractif, qui a été préféré par plusieurs auteurs pour l'isolement de la morphine base Guyot (79) [Chambon et coll. (32)].

— Mesurer le volume de la liqueur aqueuse acide issue de l'épuisement par l'éther éthylique.

— Ajouter un certain volume d'alcool à 95° de façon que la liqueur hydro-alcoolique obtenue titre 30° alcoolique (le calcul nous montre que pour 73 volumes de liqueur aqueuse, il faut 33 volumes d'alcool à 95° pour que la liqueur finale titre 30° alcoolique).

— Bien mélanger, puis alcaliniser à l'aide de NaCO_3H pulvérisé jusqu'à obtention de pH entre 7,5 et 8.

— Puis rapidement ajouter 40 ml de chloroforme lavé et agiter pendant au moins 5 mn. Séparer quantitativement la phase chloroformique. Répéter deux fois l'extraction au chloroforme, chaque fois avec 40 ml.

— Evaporer le chloroforme extractif à sec sous vide, en chauffant en même temps le ballon au B. M. à 40°C.

— Reprendre le résidu par un volume défini d'acide chlorhydrique N/2. Cette solution chlorhydrique N/2 de nalorphine est prête pour servir à son dosage et à sa caractérisation.

Remarques :

La solution aqueuse alcoolique issue de l'extraction de la nalorphine libre par le chloroforme, sera amenée à l'acidité par l'acide chlorhydrique et gardée au réfrigérateur en vue de l'isolement et du dosage ultérieurs de la nalorphine liée par la méthode de M. et P. Chambon, décrite plus loin.

L'alcalinisation doit être menée d'une manière douce pour éviter la surprise de voir déborder la mousse causée par l'addition d'une trop grande quantité de NaCO_3H à la fois. Toutefois, au cas où la mousse se forme assez abondamment, on peut la casser en inclinant l'erlenmeyer et en agitant le liquide avec une tige de verre.

Dosage :

— Nous avons effectué le dosage sur 5 ml de solution chlorhydrique N/2 de nalorphine libre par la méthode de Woods et coll. (205), modifiée par Monsieur le Professeur Chambon et coll. (32), qui a été entièrement décrite au paragraphe « étalonnage ».

— Nous avons reporté les valeurs de la D. O. trouvées à la courbe de référence pour avoir les concentrations correspondantes en nalorphine base.

Résultats expérimentaux :

— Nous avons soumis à l'extraction par la méthode de Stas-Otto-Ogier une partie des reins, du contenu intestinal, de la bile et des urines vésicales **du premier chien**.

— Nous présentons les résultats sous forme de tableau, en indiquant les concentrations en μg de la nalorphine base par g ou par ml et pour la totalité en poids ou en volume des viscères et des liquides biologiques et en pourcentage de la dose totale administrée.

Viscères ou liquides biologiques	Volume ou poids total	Concentration de nalorphinebase en μg		Pourcentage de la dose totale injectée
		par ml ou g	pour la totalité	
Urine vésicale	24 ml	8,55	206,28	0,14 %
Bile	24 ml	15,12	363,6	0,25 %
Reins	88 g	4,95	440,1	0,30 %
Contenu intestinal	188 g	3,33	630	0,43 %
Quantité totale de nalorphine base libre récupérée exprimée en mg et en pourcentage de la dose injectée.			1,639 mg	1,1 %

Distribution de la nalorphine libre chez le premier chien, 8 heures après injection par voie sous-cutanée du chlorhydrate de nalorphine à la dose de 6,8 mg/kg de poids d'animal.

II. — Méthode de M. et P. Chambon sans hydrolyse

La méthode d'isolement de la morphine des viscères et des liquides biologiques, en expertise toxicologique, de M. le Professeur Chambon et coll. (32) est une modification de celle de Woods (205). En effet, l'originalité de la méthode de M. et P. Chambon (32) réside dans l'introduction d'une nouvelle phase dans le protocole extractif, après la phase déprotéinisante. Ceci, dans l'esprit des auteurs, serait destiné à éliminer au préalable, les bases morphiniques ayant la fonction phénolique bloquée, qui pourraient interférer dans le dosage ultérieur de la morphine. D'autre part, l'isolement de la morphine en milieu alcalin bicarbonaté, se fait à l'aide du chloroforme en milieu alcoolique à 30° alcoolique suivant le travail de Guyot (79) et non avec de l'acétate d'éthyle comme l'avaient préféré Woods et coll. (205).

Dans notre travail, nous avons appliqué intégralement la méthode de M. et P. Chambon (32) sans hydrolyse pour l'isolement de la nalorphine libre des viscères et des liquides biologiques du deuxième chien.

1. — PRINCIPE DE LA MÉTHODE :

La nalorphine libre est séparée par le chloroforme en milieu alcoolique de l'extractif trichloracétique déféqué des viscères et des liquides biologiques, et amené à une légère alcalinité par le bicarbonate de sodium.

2. — RÉACTIFS :

- Sable lavé et calciné.
- Acide trichloracétique libre et en solution à 10 % et à 20 %.
- Bicarbonate de sodium pur.
- Chloroforme lavé.
- Benzène lavé.
- Acide chlorhydrique N et N/2.
- Ammoniaque pur.
- Acide chlorhydrique concentré.
- Alcool à 95°.

3. — TECHNIQUE :

a) *Déprotéinisation extractive* :

Cette déprotéinisation s'effectue différemment suivant qu'on s'adresse aux viscères ou aux liquides biologiques.

— *Cas des viscères* :

— Broyer un poids connu de viscères dans un mortier de porcelaine, avec du sable lavé et incinéré en mettant peu à peu 9 volumes d'acide chlorhydrique N/2.

— Homogénéiser et centrifuger. Séparer le surnageant et remettre en suspension dans HCl N/2 le culot de centrifugation et centrifuger à nouveau. Réunir tous les surnageants.

— Ajouter au surnageant 1/10^e de son poids d'acide trichloracétique cristallisé.

— Faire dissoudre, homogénéiser et centrifuger.

— *Cas de la bile* :

— Déprotéiniser la bile par addition de 5 volumes de solution d'acide trichloracétique à 10 %. Centrifuger.

— *Cas de l'urine* :

— Déprotéiniser par addition de 1/10^e de son poids d'acide trichloracétique. Homogénéiser et centrifuger.

— *Cas du sang et du contenu intestinal* :

— Ajouter à un poids connu de sang ou de contenu intestinal un certain volume de HCl N/2 jusqu'à l'obtention d'une bouillie homogène, assez liquide (par exemple, pour 100 g de sang, il faut environ 150 ml de HCl N/2).

— Homogénéiser et centrifuger. Recueillir le surnageant.

— Mettre le culot de centrifugation en suspension dans HCl N/2 et centrifuger à nouveau.

— Réunir tous les liquides surnageants auxquels on ajoute 1/10° de son poids d'acide trichloracétique. Homogénéiser et centrifuger de nouveau.

b) *Séparation des bases non morphinoïdes :*

— Alcaliniser la solution trichloracétique déprotéinée précédente par l'ammoniaque, au rose soutenu de la phénolphthaléine.

— Epuiser la liqueur à deux reprises, chaque fois, avec le chloroforme purifié d'abord, puis avec le benzène fraîchement distillé.

c) *Séparation de la nalorphine libre :*

— Acidifier légèrement la solution épuisée précédente, par HCl concentré.

— Mesurer le volume, puis ajouter un volume d'alcool à 95° pour que le milieu titre 30° alcoolique (33 volumes d'alcool à 95° pour 73 volumes de solution).

— Alcaliniser par NaCO_3H pulvérisé.

— Epuiser deux fois, chaque fois avec 40 ml de chloroforme lavé.

— Evaporer le chloroforme extractif à sec sous vide, au B. M. à 40°C.

— Reprendre le résidu par 10 ml HCl N/2.

Remarques :

— La solution alcaline alcoolique, après isolement de la nalorphine libre, est amenée à l'acidité par HCl concentré, et gardée au réfrigérateur en vue du dosage ultérieur de la nalorphine liée.

— Une partie de la solution chlorhydrique N/2 de nalorphine libre est employée pour son dosage et le reste pour la recherche qualitative et la chromatographie.

Dosage :

Le dosage de la nalorphine libre se fait sur 5 ml de la solution chlorhydrique N/2 obtenue ci-dessus, par la méthode de Woods et coll. (205) modifiée par Monsieur le Professeur Chambon et coll. (32) qui a été entièrement décrite au paragraphe « étalonnage ».

Nous avons reporté les valeurs de la D. O. obtenues à 5150 Å, à la courbe de référence pour avoir les concentrations correspondantes en nalorphine base.

Résultats expérimentaux :

Nous présentons les résultats sous forme de tableau, indiquant :

— La concentration de la nalorphine base en μg par ml ou g et pour la totalité de volume ou de poids de liquides biologiques ou de viscères.

— Le pourcentage de nalorphine base récupérée par rapport à la dose totale injectée.

Viscères ou liquides biologiques	Volume ou poids total	Conc. de nalorphine base en μg		Pourcentage de la dose injectée
		par g ou ml	pour la totalité	
Urine vésicale	83 ml	2,3	194,2	0,15 %
Foie	417 g	0,95	397,8	0,30 %
Reins	52 g	0,54	31,1	0,02 %
Bile	5,3 g	14	74,8	0,05 %
Sang	396 g	0,27	137,8	0,10 %
Contenu intestinal	116 g	8,3	973,8	0,75 %
Quantité totale de nalorphine base libre récupérée exprimée en mg et en pourcentage de la dose injectée.			2,010 mg	1,37 %

Distribution de la nalorphine libre chez le deuxième chien, 16 heures après injection par voie sous-cutanée du chlorhydrate de nalorphine à la dose de 10 mg/kg de poids d'animal.

CONCLUSION PARTIELLE :

— Contrairement aux résultats obtenus par Woods et coll. (207) d'une part et par Muehlenbeck et coll. (130), d'autre part, signifiant que la nalorphine libre ne sera plus décelable dans le plasma, 5 heures après l'administration de la drogue chez le chien, nous avons pu en doser des quantités de l'ordre de 0,27 $\mu\text{g/g}$ de sang, 16 heures après l'injection de la drogue.

— Nos résultats sur la bile, montrant une concentration encore assez grande de la nalorphine libre, confirment ceux obtenus par Woods et coll. (207).

B. — LA NALORPHINE LIÉE

Nous entendons par nalorphine liée, le métabolite qui n'a pas été isolé par la méthode classique de Stas-Otto-Ogier ou par la méthode de M. et P. Chambon sans hydrolyse.

La recherche du produit lié est effectuée par la méthode de M. et P. Chambon (32) avec hydrolyse :

— Sur des solutions résiduelles acides, gardées au réfrigérateur après application de la méthode classique de Stas-Otto-Ogier.

— Et sur des solutions résiduelles acides restant après extraction de la nalorphine libre par la méthode de M. et P. Chambon sans hydrolyse.

1. PRINCIPE DE LA MÉTHODE DE M. ET P. CHAMBON AVEC HYDROLYSE :

La nalorphine est libérée de ses combinaisons par hydrolyse en milieu chlorhydrique, à l'autoclave à 120°C pendant 30 mn.

2. RÉACTIFS :

- Acide chlorhydrique concentré.
- Acide trichloracétique pur et en solution à 10 %.
- Chloroforme lavé à l'eau distillée.
- Benzène lavé à l'eau distillée.
- Bicarbonate de sodium pulvérisé.
- Alcool à 95°.
- HCl N/2.

3. TECHNIQUE :

a) *Libération de la nalorphine :*

— Mesurer le volume de la solution résiduelle provenant soit de la méthode de Stas-Otto-Ogier, soit de la méthode de M. et P. Chambon sans hydrolyse.

- Ajouter 1/10^e de son volume d'acide chlorhydrique concentré.
- Puis chauffer à l'autoclave à 120°C pendant 30 mn.
- Laisser refroidir la solution hydrolysée, puis additionner à cette liqueur, 3 % d'acide trichloracétique.
- Centrifuger et recueillir le surnageant.
- Laver le culot de centrifugation avec quelques ml de solution d'acide trichloracétique à 10 %. Centrifuger et joindre le surnageant obtenu au premier surnageant.

— Epuiser la liqueur obtenue à deux reprises d'abord avec le chloroforme lavé puis avec le benzène lavé.

b) *Séparation de la nalorphine libérée :*

- Mesurer le volume de la solution.
- Ajouter à cette solution un certain volume d'alcool à 95° pour que la liqueur obtenue titre 30° alcoolique (33 volumes d'alcool à 95° pour 73 volumes de solution).

— Alcaliniser par le bicarbonate de sodium pulvérisé jusqu'à l'obtention de pH entre 7,5 et 8.

- Epuiser la liqueur alcoolique alcaline à deux reprises, chaque fois avec 40 ml de chloroforme lavé.
- Evaporer le chloroforme extractif à sec, sous vide, au B. M. à 40°C.
- Reprendre le résidu par 10 ml de HCl N/2.

Remarques :

Une partie de la solution de nalorphine libérée du produit « lié » est employée pour son dosage et le reste est gardé pour la recherche qualitative et la chromatographie.

Dosage :

— Le dosage de la nalorphine libérée du produit « lié », se fait sur sa solution dans l'acide chlorhydrique N/2, par la méthode de Woods et coll. (207), modifiée par Monsieur le Professeur Chambon et coll. (32) qui a été entièrement décrite au paragraphe « étalonnage ».

— Nous avons reporté les valeurs de la D. O. obtenues à 5150 Å à la courbe de référence pour avoir les concentrations correspondantes en nalorphine base.

Résultats expérimentaux :

Nous présentons les résultats sous forme de tableau, en indiquant les concentrations en µg de nalorphine base par g ou par ml et pour la totalité de poids ou de volume des viscères et des liquides biologiques et en pourcentage de recouvrement par rapport à la dose totale injectée.

1. — PREMIER CHIEN :

Viscères ou liquides biologiques	Poids ou volume total	Conc. de nalorphine base en µg		Pourcentage de la dose totale injectée
		par g ou ml	pour la totalité	
Urine vésicale	accident			
Bile	24 ml	978,3	23.490	16,31 %
Reins	88 g	1,26	111,6	0,07 %
Contenu intestinal	188 g	0,54	112,5	0,07 %

Quantité totale de nalorphine conjuguée exprimée
en nalorphine base en mg 23,714 mg

— Le dosage étant effectué sur les liqueurs résiduelles épuisées selon la méthode de Stas-Otto-Ogier, nous présentons ci-dessus, la distribution de la nalorphine liée, exprimée en base, issue du conjugué glycuronique, par g ou ml et par totalité de poids ou de volume des viscères et des liquides

biologiques, chez un chien, 8 heures après injection de chlorhydrate de nalorphine à la dose de 6,8 mg/kg de poids d'animal.

2. — DEUXIÈME CHIEN :

Viscères ou liquides biologiques	Volume ou poids total	Conc. de nalorphine base en μ g		Pourcentage de la dose totale injectée
		par ml ou g	pour la totalité	
Urine vésicale	83 ml	68,4	5.677,2	4,35 %
Foie	417 g	2,7	1.125,9	0,87 %
Reins	52 g	5,9	311,9	0,24 %
Bile	5,3 g	936	4.960,8	3,85 %
Sang	396 g	1,7	693,7	0,53 %
Contenu intestinal	116 g	1,2	153	0,11 %
Quantité totale de nalorphine conjuguée exprimée en nalorphine base en mg				soit 14,358 mg 9,95 %

— Le dosage est effectué sur la liqueur d'extraction de l'alcaloïde libre selon la méthode de M. et P. Chambon sans hydrolyse.

— Nous présentons ci-dessus la distribution de la nalorphine liée, exprimée en base, issue du conjugué glycuronique, par g ou ml et par totalité des poids ou de volume des viscères et des liquides biologiques, chez un chien, 16 heures après l'injection par voie sous-cutanée de chlorhydrate de nalorphine à la dose de 10 mg/kg de poids d'animal.

REMARQUES :

L'élimination urinaire ne correspond ici qu'à une fraction de la quantité de nalorphine « liée » excrétée par cette voie par suite d'une perte indéterminée de l'urine émise.

CONCLUSION PARTIELLE :

La vésicule biliaire se révèle l'organe le plus riche aussi bien en nalorphine libre qu'en nalorphine « liée ».

C. — LA NALORPHINE TOTALE

La nalorphine totale est la somme de la nalorphine libre extraite des viscères et des liquides biologiques par la méthode de Stas-Otto-Ogier ou par la méthode de M. et P. Chambon sans hydrolyse et de la nalorphine conjuguée des liqueurs résiduelles issues de l'une des méthodes ci-dessus, par la méthode de M. et P. Chambon avec hydrolyse.

Elle peut être aussi extraite directement des viscères et des liquides biologiques par la méthode de M. et P. Chambon avec hydrolyse.

Le but de cette expérience n'est pas seulement d'évaluer la concentration en nalorphine totale des viscères et des liquides biologiques, mais aussi de voir les pertes que pourraient occasionner les nombreuses opérations de filtration et de distillation de l'alcool extractif au cours de la manipulation par la méthode de Stas-Otto-Ogier.

Pour cela, nous avons soumis les viscères et les liquides biologiques restants du premier chien, directement à la méthode de M. et P. Chambon avec hydrolyse dont le principe et la technique ont été décrits plus haut, à savoir :

1. — PRINCIPE : voir paragraphe « nalorphine liée ».

2. — TECHNIQUE :

a) Déprotéinisation extractive.

b) Séparation des bases non morphiniques.

Voir paragraphe :
Méthode
de M. et P. Chambon
sans hydrolyse

c) Hydrolyse de la nalorphine liée : voir paragraphe nalorphine liée.

d) Séparation de la nalorphine libérée : voir paragraphe : méthode de M. et P. Chambon sans hydrolyse.

DOSAGE : voir paragraphe : « étalonnage ».

Résultats expérimentaux :

— Le dosage est effectué sur les liqueurs issues du traitement direct des viscères et des liquides biologiques du premier chien par la méthode de M. et P. Chambon avec hydrolyse.

— Nous présentons ci-dessous, un tableau représentant la distribution de la nalorphine totale, de la nalorphine libre et de la nalorphine liée, chez le premier chien, 8 heures après l'injection par voie sous-cutanée de chlorhydrate de nalorphine à la dose de 6,8mg/kg de poids d'animal.

Viscères ou liquides biologiques	Concentration de nalorphine exprimée en nalorphine base en $\mu\text{g/g}$ ou ml de viscères ou de liquides biologiques		
	Nalorphine totale par méth. Chambon avec hydrolyse	Nalorphine libre par méth. Stas - Otto - Ogier	Nalorphine liée dans liquides résiduels de Stas - Otto - Ogier, par méth Chambon avec hydrolyse
Urine vésicale	168,3		
Bile	1.000,8	15,12	978,3
Reins	6,3	4,95	1,26
Contenu intestinal	3,9	3,33	0,54

CONCLUSION PARTIELLE :

Il ne semble pas que la méthode de Stas-Otto-Ogier occasionne des pertes au cours d'opérations en ce qui concerne la base libre mais ignore la plus grande partie de la base éliminée qui est sous forme liée.

Tableaux récapitulatifs :

Nous rapportons ci-dessous, la distribution de la nalorphine libre, liée, et totale chez chaque chien.

1. *Pour le premier chien* : Distribution de nalorphine, 8 heures après adm. par voie s/c de nalorphine chl^o à la dose de 6,8 mg/kg de poids d'animal.

Viscères ou liquides biologiques	Concentration des différentes formes de nalorphine exprimée en nalorphine base en $\mu\text{g/g}$ ou ml de viscères ou de liquides biologiques			
	Libre par Stas-Otto-Ogier	Liée par méth. Chambon avec hydrolyse sur liquide résiduel de Stas-Otto-Ogier	Libre + liée	Totale par méth. Chambon avec hydrolyse
Urine vésicale	8,55			168,3
Bile	15,12	978,3	993,42	1.000,8
Reins	4,95	1,26	6,21	6,3
Contenu intestinal	3,33	0,54	3,8h	3,9

2. *Pour le deuxième chien* : Distribution de nalorphine, 16 heures après administration par voie sous-cutanée du chlorhydrate de nalorphine à la dose de 10 mg/kg de poids d'animal.

Viscères ou liquides biologiques	Concentration des différentes formes de nalorphine exprimée en nalorphine base en $\mu\text{g/g}$ ou ml de viscères ou de liquides biologiques		
	Libre par méth. Chambon sans hydrolyse	Liée par méth. Chambon avec hydrolyse sur liquides résiduels de cette même méth. sans hydrolyse	Totale (Libre + Liée)
Urine vésicale	2,3	68,4	70,7
Foie	0,95	2,7	3,65
Reins	0,54	5,9	6,44
Bile	14	936	950
Sang	0,27	1,7	1,97
Contenu intestinal	8,3	1,2	9,5

CHAPITRE II

IDENTIFICATION DE LA NALORPHINE

Pour effectuer la caractérisation de la nalorphine, nous nous adressons à ses solutions dans HCl N/2 obtenues par la méthode de Stas-Otto-Ogier et par la méthode de M. et P. Chambon à partir de la bile, du foie et de l'urine vésicale qui sont les organes les plus riches en nalorphine. Une partie de ces solutions a été employée pour le dosage de la nalorphine.

Nous avons fait appel à deux catégories de méthodes pour identifier la nalorphine :

- Les réactions colorées.
- La chromatographie de partage sur papier.

A. — LES RÉACTIONS COLORÉES

Comme les avait rapportées Pedley (151), les réactions colorées sont de peu de valeur pour différencier la morphine de la nalorphine car les colorations produites sont identiques, généralement reliées à la fonction phénol également libre ou au squelette de l'hydrocarbure qui est identique. C'est le cas des colorations obtenues avec le réactif de Marquis, de Mandelin, de Froehde, ou l'acide nitrique.

Dans notre laboratoire, en travaillant sur des solutions aqueuses de chlorhydrate de nalorphine et de chlorhydrate de morphine, nous avons constaté que les réactions au ferricyanure ferrique, au réactif de Lafon donnent les mêmes colorations.

Notre but est seulement de caractériser la présence de la nalorphine par des réactions classiques très sensibles de la morphine.

Nous avons effectué les réactions suivantes :

1. AVEC LE RÉACTIF DE FROEHDE :

— *Préparation :*

Molybdate de sodium	0,10 g
H ₂ SO ₄ pur	100 ml

— *Réaction :*

— Evaporer quelques gouttes de solution de nalorphine dans HCl N/2, provenant soit de la bile, soit des urines, soit du foie, dans un verre de montre, au B. M. bouillant.

— Laisser refroidir, puis ajouter deux gouttes de réactif. Nous obtenons une coloration lilas-violet passant au bleu.

2. AVEC LE RÉACTIF DE MARQUIS :

— *Préparation :*

Formol	20 gouttes
H ₂ SO ₄ pur	30 ml

— *Réaction :*

— Même opération que ci-dessus.

— Nous obtenons une coloration rouge cerise, puis violette et enfin bleue.

3. AVEC LE RÉACTIF DE LAFON :

— *Préparation :*

Sélénite d'ammonium	1 g
H ₂ SO ₄ pur	20 ml

— *Réaction :*

— Même opération qu'avec le réactif de Froehde.

— Nous obtenons une coloration vert jaunâtre intense.

4. AVEC LE RÉACTIF AU FERRICYANURE DE K — FeCl₃ :

— *Préparation :*

Solution aqueuse à 1 % de ferricyanure de K.	10 ml
Solution de FeCl ₃ du Codex	IV à V gouttes.

— *Réaction :*

— Mettre quelques gouttes de solution à étudier sur un verre de montre. Ajouter quelques gouttes de réactif. Nous obtenons un bleuissement intense et immédiat.

REMARQUES :

— Tous les réactifs ci-dessus doivent être préparés extemporanément.

B. — CHROMATOGRAPHIE

A l'exception du spectre d'absorption infrarouge [Seagers et coll. (161)] et de quelques réactions microcristallines [Pedley (151)], il est actuellement pratiquement impossible de distinguer la morphine de la nalorphine, autrement que par chromatographie de partage sur papier.

Plusieurs auteurs avaient rapporté cette méthode de recherche dont la variance réside surtout dans l'emploi du papier chromatographique. Celui-ci est imprégné :

- soit de solution de KCl M/2 [Pedley (151)] ;
- soit de solution de KH_2PO_4 M/5 [Chambon et coll. (32)] ;
- soit de solution de NaH_2PO_4 M/10 [Miltchers (126) (127)] ;
- soit de solution acétonique à 10 % de monoricinoléate de glycérol [Street (175)] ;
- soit de solution acétonique de tributyrine à 10 % [Street (175)].

Dans notre travail, nous avons appliqué la technique pratiquée par M. le Professeur Chambon et coll. (32) qui est inspirée de celle de Munier (131) et de Munier et coll. (133) (134) (135) et avons confronté le comportement de la nalorphine et celui de la morphine.

1. CUVE A CHROMATOGRAPHIE :

— Nous avons un cylindre de verre de 42 cm de haut et de 13 cm de diamètre intérieur.

— Le cylindre peut être bouché par deux plaques de verre polies et circulaires.

— La plaque supérieure servant de couvercle est percée d'un trou pouvant laisser passer un bouchon de liège, lui-même percé d'un trou où passe une tige de verre dont le bout inférieur est muni de quatre crochets.

— Un cristalliseur de 11 cm de diamètre et de 6 cm de hauteur.

2. PAPIER CHROMATOGRAPHIQUE :

Papier Whatman n° 1, imprégné de phosphate monopotassique préparé de la façon suivante :

— Découper soigneusement des bandes de papier de 33 cm $\times$ 5 cm dans du papier Whatman n° 1.

— Tremper le papier ainsi obtenu dans une solution aqueuse contenant 27,2 g de phosphate monopotassique par litre.

— Puis sécher à l'air à la température du laboratoire.

3. SOLVANT CHROMATOGRAPHIQUE :

Les études faites par Munier et coll. (135) avaient montré que, avec l'emploi du papier imprégné de solution de KH_2PO_4 M/5, les alcools supérieurs (benzylique, cyclohexanol) donnent en général des spots allongés, tandis que les alcools butyliques, propyliques, éthyliques ou l'acétone, donnent des spots sans elongations. Toujours selon ces auteurs, les meilleurs résultats seraient obtenus à l'aide de solvant saturé d'eau ou miscible à l'eau, par exemple le n. butanol. Une longue pratique de cette technique avait permis à M. le Professeur Chambon et coll. de caractériser parfaitement la morphine par l'emploi du solvant : n. butanol saturé d'eau.

Ce solvant employé par nous est préparé de la façon suivante :

— Mettre dans une ampoule à décantation un égal volume de n. butanol et d'eau distillée.

— Agiter vigoureusement pendant 5 mn.

— Laisser reposer jusqu'à séparation complète des deux phases.

— Puis recueillir la phase organique supérieure.

4. RÉACTIFS RÉVÉLATEURS :

Plusieurs réactifs ont été employés par plusieurs auteurs pour révéler :

a) La morphine :

— Réactif à l'iodoplatinate de potassium [Munier et coll. (134), Paerregaard (144)].

— Réactif iodobismuthique [Munier (132), Munier et coll. (134) (135)].

— Vapeurs d'iode [Munier (132), Munier et coll. (134)].

— Rayons ultra-violets [Munier et coll. (134)].

— Solution iodo-iodurée [Munier et coll. (134)].

— Réactifs de Dragendorff [M. le Professeur Chambon et coll. (32), Munier et coll. (134)].

b) La morphine et la nalorphine :

— Rayons ultra-violets [M. le Professeur Chambon et coll. (32), Milthers (126) (127)].

— Réactif à l'iode [M. le Professeur Chambon et coll. (32)].

— Réactif au ferricyanure de K-FeCl_3 [M. le Professeur Chambon et coll. (32)].

— Réactif à l'iodoplatinate de potassium [Street (175)].

Dans notre travail la révélation de la nalorphine et de la morphine se fait par les réactifs déjà employés par M. le Professeur Chambon et coll. (32) : réactif à l'iode, réactif de Dragendorff, lumière ultra-violette, réactif au ferricyanure de K-FeCl_3 .

— *Lumière ultra-violette* : les spots de nalorphine base et de morphine base montrent une fluorescence verte.

— *Réactif à l'iode* : c'est une solution saturée d'iode dans l'éther de pétrole.

On immerge le chromatogramme dans cette solution puis on le laisse sécher à l'air libre. Les spots de la nalorphine ou de la morphine apparaissent en brun foncé sur fond brun qui disparaît assez rapidement.

— *Réactif de Dragendorff* : formule François et Seguin (62).

— *Préparation de la solution-mère* :

Carbonate de bismuth	5 g
Eau distillée	50 ml

Délayer et ajouter :

HCl pur	10 ml
---------------	-------

Après dissolution, ajouter :

Iodure de potassium	25 g
Eau distillée	Q. S. P. 100 ml

Cette solution-mère est stable pendant 10 jours.

La solution-fille, préparée au moment de l'emploi est obtenue en diluant la solution-mère au 1/20. Elle est stable une demi-heure.

Ce réactif, révélateur d'alkaloïde au même titre que le réactif à l'iode, peut être pulvérisé directement sur les chromatogrammes ou sur les chromatogrammes déjà révélés à l'iode.

Les spots apparaissent colorés en rouge foncé sur fond jaune.

— *Réactif au ferricyanure de K-FeCl₃* :

Préparation :

— *Solution de perchlorure de fer* :

FeCl ₃	0,40 g
Alcool absolu	2,5 ml
Ether déperoxydé	15 ml

Cette solution est à préparer extemporanément.

— *Solution de ferricyanure de potassium* : Solution aqueuse à 1 % de ferricyanure de potassium additionnée d'alcool à 95° jusqu'à la limite de précipitation.

Révélation :

— Immerger la bande chromatographique dans la solution de perchlorure de fer. Laisser sécher 1 à 2 mn.

— Puis pulvériser la bande, légèrement avec la solution de ferricyanure de potassium.

Les taches apparaissent en bleu net sur fond bleu clair.

5. ISOLEMENT CHROMATOGRAPHIQUE.

Rappel :

— L'extraction de la nalorphine libre ou libérée du composé lié, des viscères ou des liquides biologiques, se faisant soit par la méthode de Stas-Otto-Ogier, soit par la méthode de M. le Professeur Chambon et coll. avec ou sans hydrolyse, nous a permis d'obtenir la nalorphine en solution dans HCl N/2. Une partie de cette solution a été employée pour le dosage et le reste sert à la caractérisation de la nalorphine par les réactions colorées et par chromatographie.

— Le dosage de la nalorphine par la méthode de Woods et coll. (205), modifiée par M. le Professeur Chambon et coll. (32) nous a permis d'obtenir d'abord de l'ester p. nitrobenzoïque de nalorphine en solution dans le dichloréthane. Une partie de cette solution (5 ml exactement) a été employée pour faire le complexe ester p. nitrobenzoïque de nalorphine-méthylorange en solution dans le dichloréthane dont une partie seulement a été employée pour la suite de la technique. Ainsi il nous reste une partie de solution d'ester et une partie de solution de complexe dans le dichloréthane que nous avons gardées au réfrigérateur. Ce sont ces solutions restantes qui nous servent à la chromatographie.

Ainsi, les matières premières qui nous servent à la recherche chromatographique de la nalorphine sont :

— Solution de nalorphine dans HCl N/2.

— Solution de l'ester p. nitrobenzoïque de nalorphine dans le dichloréthane.

— Solution de complexe ester p. nitrobenzoïque de nalorphine-méthylorange.

Le but de notre expérience, qui est principalement la caractérisation de la nalorphine, comprend aussi :

— L'étude de l'hydrolyse à l'autoclave en milieu chlorhydrique de l'ester p. nitrobenzoïque de nalorphine et caractérisation de la nalorphine libérée par chromatographie.

— L'étude du comportement chromatographique de l'ester p. nitrobenzoïque de nalorphine et du complexe ester p. nitrobenzoïque de nalorphine méthylorange.

a) Isolement de la nalorphine base :

La chromatographie étant effectuée uniquement sur la nalorphine base, il est donc nécessaire de l'isoler à partir des solutions de nalorphine dans HCl N/2. Ces dernières proviennent de la bile et des urines, après hydrolyse du conjugué.

Nous avons adopté la technique suivante :

— Prendre un certain volume de ces solutions (le volume du liquide variant avec sa richesse en nalorphine).

— Alcaliniser avec NH_3 pur jusqu'à pH 8.

— Ajouter 5 ml de chloroforme lavé et agiter énergiquement pendant 5 mn.

— Séparer la couche organique. Faire une nouvelle extraction avec 5 ml de chloroforme lavé.

— Réunir les extractifs chloroformiques et les évaporer à sec sous vide au B. M. à 40° C.

— Reprendre le résidu d'évaporation par 3 à 4 gouttes de chloroforme lavé. C'est cette solution qui nous sert à déposer les taches chromatographiques. Elle sera appelée : « nalorphine base/essai ».

Remarques : Nous avons soumis aux mêmes opérations 5 ml de la solution aqueuse de chlorhydrate de nalorphine témoin à 25 $\mu\text{g/ml}$. Nous l'appellerons « nalorphine base/témoin ».

b) *Hydrolyse de l'ester p. nitrobenzoïque de nalorphine en solution dans le dichloréthane et isolement de la nalorphine libérée* :

— Evaporer à sec un certain volume de cette solution.

— Reprendre le résidu par un volume d'eau distillée égal au volume de la solution de départ.

— Ajouter 1/10 de son volume HCl concentré.

— Faire l'hydrolyse à l'autoclave à 120°/30 mn.

— Epuiser par l'éther éthylique dépéroxydé en milieu acide pour éliminer l'acide p. nitrobenzoïque.

— Eliminer la phase étherée.

— Alcaliniser par NH_3 pur jusqu'à pH 8.

— Epuiser à deux reprises la liqueur alcaline ci-dessus chaque fois par 5 ml de chloroforme lavé.

— Réunir les extractifs chloroformiques et les évaporer à sec, sous vide au B. M. à 40° C.

— Reprendre le résidu par 3 ou 4 gouttes de chloroforme lavé. Cette solution nous sert à faire des dépôts de taches chromatographiques. Nous l'appellerons « ester nalorphine/essai ».

Remarques : Nous avons soumis aux mêmes opérations l'ester p. nitrobenzoïque de nalorphine témoin. Nous l'appellerons « ester nalorphine/témoin ».

c) *Ester p. nitrobenzoïque de nalorphine* :

— Evaporer la solution de cet ester dans le dichloréthane à sec, sous vide au B. M. à 40° C.

— Reprendre le résidu par 3 à 4 gouttes de dichloréthane. La solution obtenue sera appelée : « ester p. nitrobenzoïque/essai ».

Nous avons aussi soumis aux mêmes opérations, la solution de « l'ester p. nitrobenzoïque de nalorphine/témoin ».

d) *Complexe p. nitrobenzoïque de nalorphine-méthylorange* :

La solution de ce complexe dans le dichloréthane est soumise aux mêmes opérations que l'ester p. nitrobenzoïque de nalorphine. Il en est de même que pour le complexe p. nitrobenzoïque de nalorphine-méthylorange/témoin.

6. DÉPÔTS DES TACHES :

— Tracer au crayon noir un trait horizontal de 4 cm de la base sur des bandes de papier précédemment préparées et sèches.

— Localiser sur ce trait 2 à 3 points à 2 ou 3 cm d'intervalles suivant les besoins.

— Suivant le but poursuivi, déposer des taches appropriées de produit à étudier en faisant migrer parallèlement le produit témoin.

7. TECHNIQUE CHROMATOGRAPHIQUE :

C'est une chromatographie ascendante de partage sur papier tamponné.

Le cylindre de verre, les deux couvercles, le cristalliseur étant propres et secs.

— Mettre en place le cylindre de verre sur la plaque servant de base.

— Enduire la base du cylindre à l'aide du silicone pour la rendre étanche.

— Introduire avec précautions dans le cylindre, le cristalliseur.

— Mettre dans l'espace entre la paroi du cristalliseur et celle du cylindre, de l'eau saturée de butanol et dans le cristalliseur du butanol saturé d'eau (hauteur du butanol dans le cristalliseur est environ 2 cm).

— S'assurer que la paroi du cylindre ne soit pas mouillée par aucun des solvants.

— Introduire dans le cylindre, les bandes chromatographiques préalablement fixées aux crochets respectifs de la tige de verre et appliquer exactement le couvercle de verre qui les supporte sur le bord supérieur du cylindre enduit de silicone pour assurer l'étanchéité.

— Puis, sans que le bord inférieur du papier touche le butanol, laisser l'ensemble au repos pendant au moins 30 mn, temps minimum nécessaire pour que les bandes chromatographiques soient en équilibre avec l'atmosphère du cylindre.

— Puis, en poussant avec précautions le bout supérieur de la tige de verre, faire immerger les bases des bandes de papier chromatographique (1 cm environ) dans le butanol. S'assurer que les bandes ne se touchent pas.

— Laisser le chromatogramme se développer pendant 14 h : nous avons

mis les chromatogrammes à 19 h et nous les sortons le lendemain matin vers 9,30 h-10 h.

— Sortir de la cuve les chromatogrammes. Localiser au crayon noir le front de migration du solvant et laisser sécher à l'air libre.

8. RÉVÉLATIONS :

Sur les bandes chromatographiques sèches nous avons fait la révélation avec les réactifs suivants :

a) *Avec la lumière ultra violette :*

Les spots de nalorphine base, de l'ester p. nitrobenzoïque de nalorphine apparaissent colorés en vert à bordures peu nettes.

b) *Avec le réactif à l'iode :*

Les spots de la nalorphine base et de l'ester p. nitrobenzoïque se montrent en brun foncé sur fond brun, de forme légèrement allongée et de contours nets.

c) *Avec le réactif de Dragendorff :*

Les spots, colorés en rouge foncé sur fond jaune, ont même aspect que ceux révélés à l'iode.

Les réactifs ci-dessus ne révèlent que la présence de l'alcaloïde et non celle du groupement phénolique réducteur qui est mis en évidence par le réactif au ferricyanure de $K-FeCl_3$. Ainsi pour pouvoir effectuer sur la même bande chromatographique, la mise en évidence à la fois de l'alcaloïde et de son groupement phénol, nous préférons l'emploi d'abord du réactif à l'iode qui disparaît assez vite de la bande, puis du réactif au ferricyanure de $K-FeCl_3$.

d) *Avec le réactif au ferricyanure de $K-FeCl_3$:*

Les taches de nalorphine base apparaissent en bleu net, sur fond bleu clair avec les mêmes aspects que celles révélées à l'iode.

9. RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX :

— La nalorphine base est révéléable par tous les réactifs ci-dessus cités.

— L'ester p. nitrobenzoïque de nalorphine n'est pas révéléable par le réactif au ferricyanure de $K-FeCl_3$.

— Nous avons calculé les valeurs du R_f suivantes :

— Nalorphine base : $R_f = 0,46$.

— Ester p. nitrobenzoïque de nalorphine : $R_f = 0,88$ à $0,91$.

— Hélianthisine (méthylorange) libéré du complexe p. nitrobenzoïque de nalorphine-méthylorange au cours de migration : $R_f = 0,61$ à $0,63$.

CONCLUSION PARTIELLE :

La chromatographie ascendante de partage sur papier imprégné de phosphate monopotassique avec solvant n. butanol saturé d'eau, nous permet de tirer des conclusions suivantes :

— Le produit que nous avons extrait des viscères et des liquides biologiques des chiens traités au chlorhydrate de la nalorphine, dosé et caractérisé par des réactions colorées, est de la nalorphine.

— Le papier chromatographique imprégné de phosphate monopotassique est suffisamment acide pour permettre la coupure de la liaison ester p. nitrobenzoïque de nalorphine-méthylorange au cours de migration.

— La réaction avec le réactif au ferricyanure de potassium-perchlorure de fer n'est pas possible après la réaction avec le réactif de Dragendorff, sur le même chromatogramme car la coloration obtenue avec ce dernier est trop intense et qui, en plus, ne disparaît pas, contrairement à la coloration obtenue avec le réactif à l'iode.

— La liaison ester entre l'acide p.nitrobenzoïque et la nalorphine se fait sur OH phénolique de cette dernière.

— L'ester p.nitrobenzoïque de nalorphine est hydrolysé par chauffage à l'autoclave à 120° C/30 mn, en milieu chlorhydrique, en libérant de la nalorphine que nous avons pu caractériser par chromatographie.

Chromatographie du mélange de bases extraites de la solution aqueuse contenant à la fois, des chlorhydrates de morphine et de nalorphine :

La nalorphine est employée en thérapeutique actuellement comme antagoniste de la dépression respiratoire causée par la morphine et les morphinomimétiques. Il est donc possible de le rencontrer dans des cas toxicologiques ou autres, d'intérêt médico-légal où elle pourrait être prise pour la morphine ou des composés morphinomimétiques dans certaines circonstances.

Ainsi, il est important d'avoir une méthode pour distinguer ces deux drogues.

Actuellement, la chromatographie de partage sur papier semble être la méthode la meilleure.

La technique chromatographique employée par Milthers (126) (127), avec du papier Whatman n° 1 imprégné d'une solution de pH 6,3 composée de 15,6 g de NaH_2PO_4 , $2\text{H}_2\text{O}$, de 3,5 ml de solution de soude à 30 % et d'eau distillée Q. S. P. 1.000 ml, et inspirée de celle de Paerregaard (144), bien que donnant une bonne séparation entre la normorphine, la nalorphine et la morphine avec des R_f respectivement de 0,04, 0,50 et 0,08 a l'inconvénient d'employer un système solvant formulé par Brossie et coll. (23) contenant de l'hydrate d'amylène, du di-n-butyléther et d'eau dans la proportion 80/7/13. Or, le di-n-butyléther [Milthers (127)], ainsi que l'éther ordinaire [M. le Professeur Chambon (31)] contiennent des peroxydes qui se forment au cours du stockage et qui altèrent gravement la morphine, la nalorphine et la normorphine [Milthers (127)], et transforment la morphine en N-oxyde soluble dans l'eau [M. le Professeur

Chambon (31)]. Pedley (151), modifiant d'une part la technique de Munier et coll. (133) (134) par l'emploi du papier Whatman n° 1 imprégné de solution de KCl 0,5 M, et d'autre part, la technique de Curry et coll. (39) par l'emploi de la technique descendante, avait pu séparer nettement la morphine de la nalorphine surtout avec le solvant formé de n-butanol-acide acétique, le tout saturé d'eau.

Récemment, Street (175) avait décrit deux méthodes chromatographiques dont la plus séduisante dans le sens qu'elle permet une séparation rapide (15 mn) et nette entre la morphine, la nalorphine et la codéine fait appel au papier traité à la tributyrine. Seulement cette technique nécessite l'emploi d'une cuve chauffée à 86°C.

Bien que les méthodes citées ci-dessus soient satisfaisantes pour séparer la morphine de la nalorphine, nous ne les avons pas préférées à celle de M. le Professeur Chambon dont la technique a été bien éprouvée dans notre laboratoire. Cette technique n'est autre que celle que nous avons décrite plus haut dans l'étude chromatographique de la nalorphine.

Dans notre travail nous sommes partis d'une solution aqueuse contenant à la fois du chlorhydrate de nalorphine et du chlorhydrate de morphine à la concentration de 25 µg/ml chacun.

Nous en avons isolé le mélange de bases nalorphine et morphine selon la technique décrite plus haut, relative à l'isolement de la nalorphine base.

Nous avons suivi la même technique chromatographique que pour la recherche de la nalorphine seule.

Nous avons obtenu les résultats suivants :

— les spots de nalorphine base et de morphine base qui sont de mêmes colorations avec un réactif donné (réactif à l'iode, de Dragendorff, au ferricyanure de K_3FeCl_6) sont de forme ovale à contours nets. D'autre part le spot de nalorphine est nettement séparé de celui de la morphine.

— Les valeurs de R_f calculées sont :

— Morphine base/Témoin : $R_f = 0,13$.

— Nalorphine base/Témoin : $R_f = 0,42$.

— Mélange bases morphine/nalorphine :

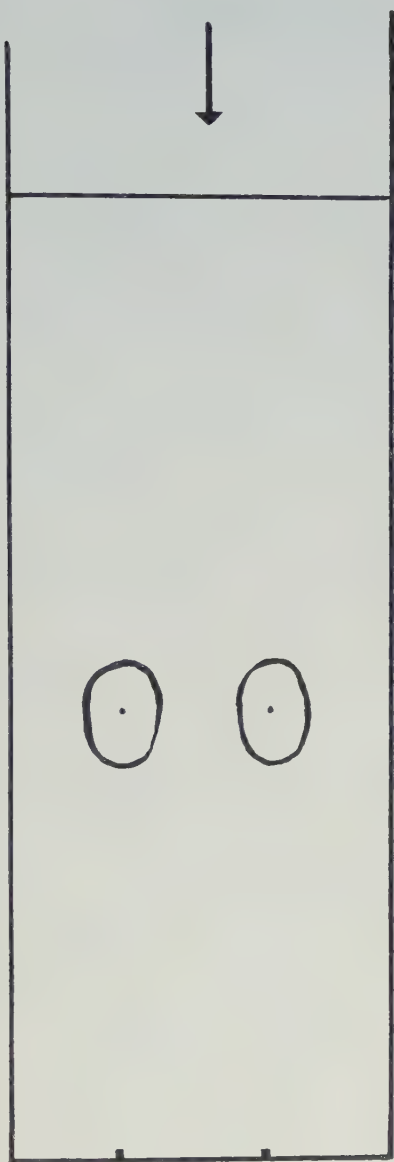
1^{er} $R_f = 0,13$.

2^e $R_f = 0,42$.

CONCLUSION PARTIELLE :

La chromatographie de partage sur papier phosphaté permet de séparer nettement la morphine de la nalorphine avec le solvant n.butanol saturé d'eau.

Front solvant



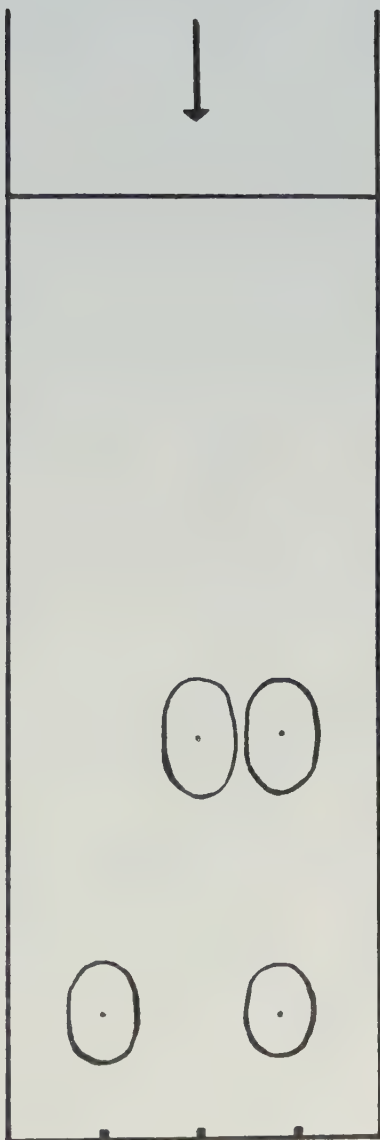
1

2

Chromatographie de Nalorphine base
extraite de la bile de chien ;

- 1 : Nalorphine base Témoin
- 2 : Nalorphine base extraite

Front solvant



1

2

3

Chromatographie du mélange de Nalorphine
base et de Morphine base :

- 1 : Morphine base/Témoin
- 2 : Nalorphine base/Témoin
- 3 : Mélange Nal. base et de
Morph. base

C. — AMINOXYDE DE NALORPHINE ET OXYDINALORPHINE

1. AMINOXYDE DE NALORPHINE :

M. le Professeur Chambon avait mis en évidence par chromatographie, la présence de l'aminooxyde de morphine et partant la transformation en ce composé, de la morphine sous l'action de l'éther riche en peroxydes employé dans les extractions courantes. Guidés par cette idée, nous essaierons de préparer l'aminooxyde de nalorphine et de le caractériser par chromatographie de partage sur papier.

a) *Préparation :*

Nous avons adopté la technique suivante :

— Prendre 5 ml de solution aqueuse contenant 100 $\mu\text{g/ml}$ de chlorhydrate de nalorphine.

— Alcaliniser par NH_3 pur jusqu'à pH 8.

— Epuiser deux fois, chaque fois par 20 ml d'éther déperoxydé par du sodium tréfilé.

— Evaporer à sec les éthers extractifs.

— Reprendre le résidu par 3 ml d'eau oxygénée à 30 volumes.

— Laisser au repos une nuit.

— Puis évaporer à sec le liquide réactionnel dans le vide sur l'acide sulfurique.

— Reprendre le résidu par deux gouttes d'eau distillée. Ce liquide sert à déposer des taches.

b) *Technique chromatographique :*

— Nous avons employé la même technique chromatographique que pour l'étude de la nalorphine base, avec le même solvant et le même papier.

— Sur le même papier phosphaté, nous avons fait migrer parallèlement à l'aminooxyde de nalorphine préparé comme ci-dessus, l'aminooxyde de morphine préparé dans les mêmes conditions, la nalorphine base témoin et la morphine base témoin.

c) *Révélation :*

Elle se fait à l'aide de la solution d'iode dans l'éther de pétrole.

Les spots obtenus sont ronds et nets, de couleur foncé sur fond brun clair.

Nous avons calculé les valeurs de Rf suivantes :

Nalorphine base/témoin	Rf = 0,45 à 0,46
Aminoxyde nalorphine	Rf = 0,63 à 0,65
Morphine base/témoin	Rf = 0,15 à 0,16
Aminoxyde morphine	Rf = 0,19

Remarques : Nous n'avons pas pu obtenir des spots nets par l'emploi du papier Whatman n° 1 neutre, en particulier pour la nalorphine base et son aminoxyde.

2. OXYDINALORPHINE :

M. le Professeur Drevo (47) avait rapporté que la morphine qui ne se transforme pratiquement pas *in vivo* en oxydimorphine, l'est facilement *in vitro* sous l'action du sang ou du sérum additionné d'eau oxygénée.

De même nous essaierons de préparer l'oxydinalorphine et de le caractériser.

a) Préparation :

— Dans un premier temps, nous préparons la base nalorphine comme précédemment.

— Puis nous reprenons le résidu de base par 5 ml d'éther peroxydé contenant une goutte de soude à 30 %.

— Laisser reposer une nuit.

— Puis évaporer à sec.

— Reprendre le résidu par deux gouttes d'eau distillée. La solution ainsi obtenue nous sert à déposer des taches.

b) Technique chromatographique :

— Nous avons employé la technique décrite pour l'étude de la nalorphine base, avec le même solvant, cependant avec du papier Whatman n° 1 neutre.

— Sur la même bande chromatographique, nous avons fait migrer parallèlement à l'oxydinalorphine, de la nalorphine base/témoin, de la morphine base/témoin et de l'oxydimorphine préparé dans les mêmes conditions.

— Les valeurs de Rf calculées sont :

Nalorphine base	Rf = 0,68
Oxydinalorphine	Rf = 0,04
Morphine base	Rf = 0,40
Oxydimorphine	Rf = 0,04

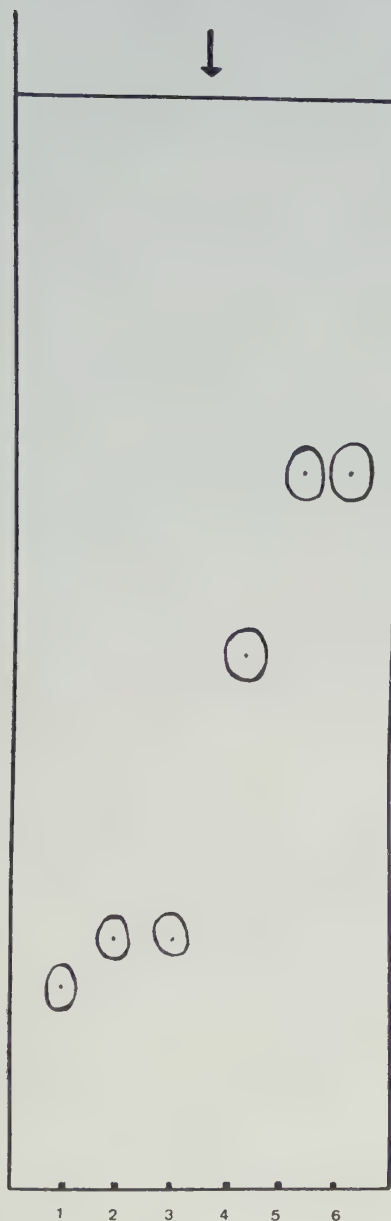
Remarques : Nous n'avons pas pu obtenir de spots nets avec le papier Whatman phosphaté.

CONCLUSION PARTIELLE :

— On peut aussi différencier la nalorphine de la morphine en les transformant en aminoxydes et non en oxydinalorphine ou oxydimorphine.

— Nous avons tenu à faire cette étude des aminoxyde et oxydinalorphine afin de nous permettre éventuellement de détecter ces produits de transformations dans nos extraits de viscères ou de liquides biologiques. En fait nous n'avons jamais trouvé au cours des développements chromatographiques des alcaloïdes extractifs séparés, aucun spot rappelant ces produits d'oxydation. Ceux-ci du reste doivent être considérés comme des artéfacts.

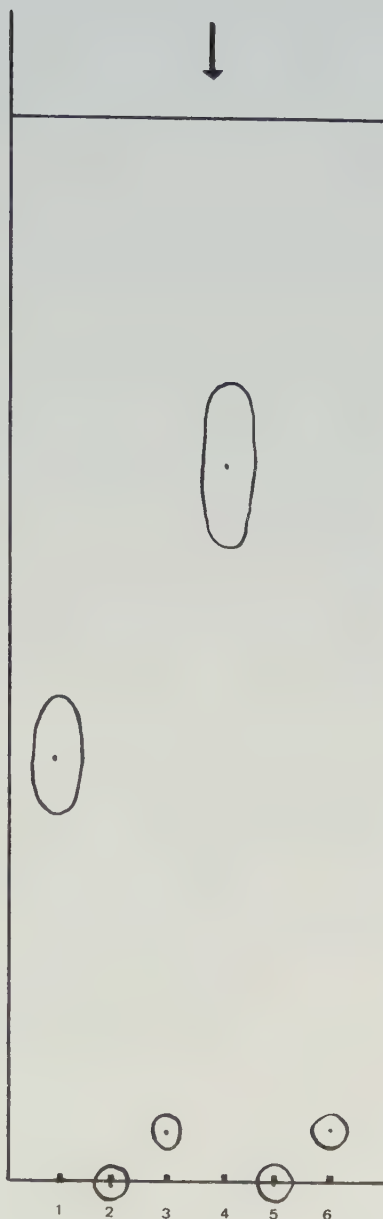
Front solvant



Chromatographie des Aminoxydes de Nalorphine et des aminoxydes de Morphine ; sur papier phosphaté :

- 1 : Morphine base
- 2 et 3 : Aminoxydes de Morphine
- 4 : Nalorphine base
- 5 et 6 : Aminoxydes de Nalorphine

Front solvant



Chromatographie des oxydes de Nalorphine et de Morphine, sur papier Whatman neutre :

- 1 : Morphine base
- 2 : Aminoxyde de Morphine
- 3 : Oxydimorphine
- 4 : Nalorphine base
- 5 : Aminoxyde Nalorphine
- 6 : Oxydinalorphine

CHAPITRE III

GLYCURONIDE DE NALORPHINE

La nature chimique de la morphine liée fut soupçonnée comme étant un glycuronide par Oberst (137) du fait de l'existence de la proportion entre la quantité d'acide glycuronique excrétée dans l'urine et la dose de morphine administrée. Plus tard, les principaux travaux de Fujimoto (67), de Fujimoto et coll. (68) (69) (70), de Seibert et coll. (165) et de Woods (203) (204) confirment la nature glycuronique de la morphine liée excrétée par la bile et l'urine.

Quant à l'existence du glycuronide de nalorphine, Axelrod et coll. (8) l'avaient prouvée d'une manière indirecte grâce à l'emploi de la β glycuronidase qui hydrolyse spécifiquement les glycuronides.

Dans ce chapitre, nous essaierons d'isoler et d'identifier le glycuronide de nalorphine dans les urines des chiens traités à la nalorphine.

I. — Isolement

Plusieurs auteurs avaient rapporté des méthodes d'isolement du glycuronide qui peuvent se grouper grossièrement en deux types :

— Le premier type de méthode comprend 3 phases successives :

— Relargage du glycuronide de sa solution dans les urines, par un sel neutre (K_2CO_3) [Fujimoto (67), Fujimoto et coll. (69)].

— Adsorption par charbon [Fujimoto et coll. (68) (69)].

— Purification par électrophorèse en continu d'abord, puis par distribution à contre-courant et enfin par chromatographie de partage sur papier [Fujimoto et coll. (69)].

— Le deuxième type de méthode décrit par Seibert et coll. (165) et par Woods (203) (204), consiste d'abord dans une adsorption de glycuronide par chromatographie sur colonne de cellulose et ensuite par purification du glycuronide par le méthanol et par chromatographie de partage sur papier.

Dans notre travail nous appliquons cette dernière méthode à l'isolement du glycuronide de nalorphine dans les urines des chiens traités par cette drogue.

La technique détaillée en est la suivante :

1. PRÉPARATION DE L'URINE :

— Triturer au mortier, une prise d'essai d'urine préalablement amenée à pH 7,4, avec de la poudre d'uréase (pour 100 ml d'urine il faut 3 g d'uréase).

— Porter à 37° pendant au moins 30 mn.

— Laisser refroidir.

— Centrifuger puis filtrer le surnageant.

— Concentrer à chaud vers 70°C sous vide jusqu'à 20 ml environ, puis évaporer à sec, sous vide dans un dessicateur sur l'acide sulfurique et sur la potasse.

2. PRÉPARATION D'UNE COLONNE DE CHROMATOGRAPHIE SUR CELLULOSE :

— La colonne doit mesurer environ 760 mm x 17 mm. La partie supérieure porte un évasement permettant d'adapter une tubulure de verre destinée, par la hauteur de liquide introduit, à assurer une pression de 7 à 8 cm de mercure sur la couche adsorbante.

— Mettre un tampon de laine de verre à la partie inférieure de la colonne.

— Remplir la colonne sur une hauteur de 37 à 40 cm d'une bouillie de poudre de cellulose Whatman n° 1 pour chromatographie, dans le mélange n.butanol — acide acétique — eau à la proportion de 40/10/20.

3. PRÉPARATION DE L'EXTRAIT URINAIRE :

— Triturer l'extrait sec urinaire précédemment préparé, avec un mélange composé de :

Eau distillée	20 ml
n.butanol	40 ml
Acide acétique	10 ml

(En général, on prend le volume de ce mélange égal à celui de la prise d'essai de l'urine de départ.)

— Centrifuger et filtrer le surnageant.

4. CHROMATOGRAPHIE PROPREMENT DITE :

— Passer le filtrat sur la colonne de cellulose.

— Quand l'extrait urinaire a presque entièrement passé à travers la colonne, développer sur la poudre de cellulose une pression de 7 à 8 cm de mercure à l'aide du mélange ci-dessus (300 ml).

— Rejeter les 105 premiers millilitres de liquide ainsi que tous les liquides qui ont passé antérieurement à travers la colonne.

— Recueillir les 105 ml suivants.

5. PURIFICATION DU GLYCURONIDE :

- Evaporer cette solution à sec par distillation sous vide.
- Epuiser successivement le résidu d'évaporation avec 2 fois 2 ml d'eau froide.
- Centrifuger et recueillir le surnageant.
- Ajouter au surnageant 20 ml de méthanol froid. Mélanger.
- Centrifuger.
- Décanter le liquide surnageant et l'évaporer à sec.
(On peut renouveler le traitement précédent.)
- Faire bouillir 5 mn ce résidu avec 20 ml de méthanol.
- Séparer le méthanol par centrifugation.
- Renouveler cette extraction du même résidu au méthanol.
- Réunir les deux solutions méthanoliques.
- Evaporer à sec par distillation sous vide.
- Dissoudre le résidu dans 4 ml d'eau distillée et ajouter 10 ml de méthanol froid.
- Centrifuger.
- Concentrer le surnageant à un très faible volume.
- Faire la chromatographie ascendante de partage sur papier Whatman n° 1 en déposant en une barre toute la totalité du liquide concentré, et en développant le chromatogramme avec le solvant suivant :

n.butanol	10 ml
Acide acétique	3 ml
Eau	4,5 ml

- Sur une petite bande découpée dans la longueur du chromatogramme sec, faire la révélation à l'iode pour localiser l'endroit où se trouve le glycuronide de l'alkaloïde.
- Découper la bande dans la région ainsi délimitée.
- Eluer le glycuronide de l'alkaloïde dans une enceinte fermée à l'aide de l'eau distillée. Si besoin est, concentrer l'éluat à un faible volume.

II. — Identification du glycuronide

L'identification du glycuronide de morphine a été effectuée d'une part par Fishman et coll. (60) à l'aide du réactif au naphtrésorcinol et d'autre part, par Fujimoto et coll. (69) grâce à l'analyse élémentaire.

D'autres auteurs préfèrent caractériser l'acide glycuronique libéré du glycuronide de l'alkaloïde par hydrolyse chimique ou enzymatique, soit par chromatographie de partage sur papier avec solvant composé de n.butanol

— Acide acétique — Eau distillée dans la proportion de 10/3/4,5 ; soit par réactions colorées que donnent les acides uroniques avec la solution alcoolique de carbazole [Dische (45)] ou avec le naphtorésorcinol [Jorpes et coll. (101), Deichmann et coll. (41)].

Dans notre travail de caractérisation du glycuronide de nalorphine, nous avons donné une entière confiance à la technique décrite par Fishman et coll. (60) que nous avons cependant contrôlée avec le glycuronide de bornéol préparé au laboratoire.

a) *Principe de la méthode de Fishman :*

Cette méthode consiste dans une élimination de l'acide glycuronique et des autres substances oxydables pouvant interférer dans la réaction, par l'oxydation à l'aide d'une solution d'iode dans des conditions fixées par Levy et coll. (113), puis en une hydrolyse du glycuronide en milieu fortement acide, libérant l'acide glycuronique qui réagira avec le naphtorésorcinol en donnant une coloration violette passant dans le toluène.

b) *Réactifs :*

— Toluène.

— Alcool éthylique à 95 %.

— Tampon pH 10,1 :

Bicarbonate de sodium	8,4 g
Carbonate de sodium anhydre	36 g
Eau distillée	1.000 ml

— Solution aqueuse d'iode N/10 dans IK (gardée à l'abri de la lumière).

— Solution de bisulfite de sodium 1 M :

Bisulfite de sodium	10,4 g
Eau distillée	100 ml

(Solution stable pendant deux semaines au maximum.)

— Acide sulfurique 6 N.

— Acide sulfurique 18 N.

— Solution aqueuse de naphtorésorcinol à 0,4 % préparée de la façon suivante : Triturer 0,4 g de naphtorésorcinol dans un mortier avec 100 ml d'eau distillée. Filtrer et garder la solution à l'abri de la lumière (Cette solution est à refaire tous les jours).

c) *Technique :*

— Pipeter 5 ml d'éluat de glycuronide d'alcaloïde, dans une fiole d'erlenmeyer de 50 ml, bouchant émeri, contenant 2,05 ml de tampon carbonate.

— Ajouter 1,5 ml de solution d'iode N/10.

- Agiter légèrement et laisser l'erlenmeyer 30 mn à l'obscurité.
- A la fin de ce temps, ajouter 0,15 ml de solution de bisulfite de sodium.
- Agiter et additionner de 0,3 ml d'acide sulfurique 6 N (la solution résiduelle d'iode peut être détruite par une goutte de solution de bisulfite de sodium).
- Agiter l'erlenmeyer pour éliminer l'excès de CO₂ de la solution.
- Prendre 4 ml de cette solution et les mettre dans un tube à essai en pyrex.
- Ajouter 2 ml de solution de naphtorésorcinol et 2 ml d'acide sulfurique 18 N.
- Mélanger et porter le tube au B. M. bouillant pendant 90 mn.
- Après ce temps, refroidir le tube sous un courant d'eau froide.
- Transvaser le contenu dans une fiole d'erlenmeyer.
- Ajouter 10 ml d'alcool à 95 % et agiter pour dissoudre le pigment.
- Puis ajouter 8 ml de toluène.
- Agiter vigoureusement : la présence de glycuronide d'alcaloïde est révélée par l'apparition d'une coloration violette plus ou moins intense de la phase toluène.

d) *Résultats expérimentaux :*

Nous avons pu ainsi identifier le glycuronide de nalorphine dans les urines du chien traité par cette drogue, cette réaction de Fishman s'étant révélée très nettement positive.

QUATRIÈME PARTIE

DISCUSSION

Woods et coll. (207) avaient rapporté des valeurs de la distribution de la nalorphine libre et conjuguée dans les viscères et liquides biologiques, chez les chiens, nous permettant ainsi d'en faire une comparaison avec celles obtenues par nous chez la même espèce animale.

D'autre part, il serait d'un intérêt toxicologique certain de confronter les résultats obtenus par Woods et coll. (207) et par nous, concernant la nalorphine, avec ceux rapportés par Woods (204) pour la morphine, dans le but de rechercher la part revenue à la morphine dans les cas d'intoxications morphiniques où la nalorphine a été employée thérapeutiquement.

Cependant cette comparaison ne sera possible que dans la mesure où nous considérons la valeur du rapport entre l'alkaloïde libre et l'alkaloïde lié, car ce rapport serait vraisemblablement indépendant de la dose injectée tandis que l'intervalle de temps entre l'injection de la drogue et le sacrifice de l'animal doit intervenir dans le métabolisme de la drogue et son élimination.

Des valeurs rapportées par Woods (204) et par Woods et coll. (207), nous ne relevons que celles qui permettent une comparaison avec les nôtres. Pour cela, nous rapportons seulement les concentrations de la nalorphine libre et liée ou de morphine libre et liée et nous calculons le rapport entre le produit libre et le produit lié dans les viscères et les liquides biologiques suivants : la bile, le foie, les reins, le sang, le contenu intestinal et l'urine vésicale.

Cependant nous tenons à faire les remarques suivantes :

— Woods (204) et Woods et coll. (207) avaient calculé les concentrations de morphine libre et de morphine liée dans des segments bien individualisés des intestins. Ainsi pour pouvoir comparer leurs résultats avec les nôtres, au niveau du contenu intestinal, nous avons tout simplement additionné les concentrations trouvées par eux dans les différentes parties des intestins.

— Les concentrations de morphine libre et de morphine liée dans l'urine vésicale sont calculées par Woods (204) en pourcentage de la dose injectée

à partir desquelles nous calculons le rapport entre la morphine libre et la morphine liée.

Ces remarques étant formulées, nous relevons les résultats suivants :

— D'après table II, tirée de Woods (204), page 164 : concentration de morphine base en $\mu\text{g/g}$ ou ml chez le chien tolérant (intoxiqué chronique) injectée par voie sous-cutanée de 30 mg/kg de morphine, 4 heures après l'injection :

	Libre	Liée
Jéjunum	6	24
Colon	9	2
Total	15	26

$$\text{Rapport } \frac{\text{morphine libre}}{\text{morphine liée}} = 15/26 = 1/1,73.$$

Urine vésicale (en pourcentage de la dose injectée) :

Libre	Liée
—	—
10,7 %	40,4 %

$$\text{Rapport } \frac{\text{pourcentage morphine libre}}{\text{pourcentage morphine liée}} = 10,7/40,4 = 1/3,77.$$

— D'après table VII, tiré de Woods (204), page 169 : pourcentage de doses injectées recueillies de morphine libre et de morphine liée, chez le chien non tolérant, 12 heures après l'injection :

	Libre	Liée
	—	—
Duodénum	0,004 %	0,120 %
Jéjunum	0,014 %	0,570 %
Iléum	0,011 %	0,750 %
Colon	0,35 %	2, %
Total	0,379 %	3,440 %

$$\frac{\text{Pourcentage morphine libre}}{\text{Pourcentage morphine liée}} = 1/9,08$$

	Libre	Liée
	—	—
Urine vésicale	8,6 %	47,8 %

$$\text{Rapport } \frac{\text{Pourcentage morphine libre}}{\text{Pourcentage morphine liée}} = 1/5,55$$

Nous rassemblons ci-dessous sous forme de tableau, les résultats obtenus par Woods (204), par Woods et coll. (207) et par nous :

Viscères ou liquides biologiques	Alcaloïde et rapport de la forme libre à la forme liée rapport forme libre	Nos résultats exprimés en µg/g ou ml.		Résultats obtenus par Woods et coll. (207) en µg/g ou ml.	Résultats obtenus par Woods (204) en µg/g ou ml.
		Nalorphine base	Nalorphine base		
		Chien I : 8 h. après l'inj. par voie S/C. de 6,8 mg/kg de chl ¹⁰ de nalorphine	Chien II : 16 h. après l'inj. par voie S/C. de 10 mg/kg de chl ¹⁰ de nalorphine		
Bile	Libre Liée Rapport	15,12 978,3 1/64,7	14 936 1/66,6	12 1.020 1/85	27 3.500 1/129,62
	Libre Liée Rapport	Accidents	0,95 2,7 1/2,83	5 5 1	3 17 1/5,66
Reins	Libre Liée Rapport	4,95 1,26 3,92/1 analyse tardive	0,54 5,9 1/11 analyse immédiate	5 5 1	12 19 1/1,58
	Libre Liée Rapport	Accidents	0,27 1,7 1/6,33	5 5 1	Pas de valeur
Sang	Libre Liée Rapport	3,33 0,54 6,16/1 analyse tardive	8,3 1,2 6,64/1 analyse tardive	10 104 1/10,4	Chien non tolérant, 12 h. après l'inj. S/C. de la même dose
	Contenu intestinal			1/9,08	Chien tolérant, 4 h. après l'inj. S/C. de la même dose
Urine vésicale	Libre Liée Rapport	8,55 159,77 1/18,67	2,3 68,4 1/29,2	Pas de valeur	1/5,55
					1/1,73
					1/3,77

Cas de la bile :

Nous avons les valeurs de rapport entre la nalorphine libre et la nalorphine liée sensiblement égales pour nos deux chiens. Ces valeurs sont un peu plus fortes que celles de Woods et coll. (207). Peut-être la dose injectée aurait-elle une influence sur ce rapport dans le sens que plus la dose injectée est grande plus ce rapport est faible. Cependant, dans l'observation de Woods et coll., le délai écoulé entre l'injection et le prélèvement est plus court, 4 h au lieu de 8 ou 16 h.

Comparé à celui de la morphine, le rapport entre la nalorphine libre et la nalorphine liée est beaucoup plus grand, c'est-à-dire que la proportion de morphine conjuguée est beaucoup plus grande par rapport à la morphine libre. Selon Cochin et coll. (35), cette différence est le fait d'une plus grande vitesse de conjugaison et d'élimination de la morphine.

Cas du foie :

Woods et coll. (207) avaient trouvé des concentrations presque égales entre la nalorphine libre et la nalorphine liée, contrairement à nos résultats. Ces derniers sont dans le même ordre que pour la morphine, c'est-à-dire qu'il y a plus de produit lié que de produit libre dans le foie.

Cas des reins :

En considérant les résultats que nous avons obtenus pour nos deux chiens, nous constatons que la nalorphine libre est plus abondante que la nalorphine liée chez le premier chien et c'est l'inverse pour le second. Or, les reins du premier chien n'ont été analysés que quatre mois et demi après prélèvement, alors que ceux du second chien furent analysés immédiatement. Ce stockage, bien que réalisé à une température inférieure à $+ 4^{\circ}\text{C}$, provoquerait une hydrolyse enzymatique ou chimique encore mal déterminée, libérant ainsi l'alkaloïde libre qui peut être à son tour altéré par un mécanisme chimique quelconque. Ainsi les toxicologues devraient tenir compte de ce facteur temps de stockage ou éventuellement d'inhumation, dans leur expertise. Cette observation sera l'objet de nos études ultérieures en vue d'une confirmation définitive.

Cas du sang :

Muehlenbeck et coll. (130) avaient rapporté que, le rapport entre la nalorphine libre et la nalorphine liée, dans le plasma, 60 mn après l'injection de nalorphine base à la dose de 30 mg/kg de poids de chien, est de 1/5 environ, et que la nalorphine sera seulement à l'état de traces 2 h après l'injection. Cependant, Woods et coll. (207) avaient trouvé le rapport à peu près égal à 1 ainsi que nous l'avons calculé d'après les chiffres donnés par lui. Nos résultats semblent donc plutôt se ranger à côté de ceux de Muehlenbeck et coll. (130), traduisant en plus, d'une part une plus grande concentration de nalorphine liée que de nalorphine libre et d'autre

part, la présence appréciable de la drogue dans le plasma 16 h après l'injection.

Cas du contenu intestinal :

Les remarques sont les mêmes que celles faites au sujet des reins. En effet, ces excréta sont analysés plus de 3 mois après le prélèvement pour les deux chiens. Le séjour dans le réfrigérateur, n'empêche donc pas le système enzymatique ou chimique d'hydrolyser la nalorphine liée.

Cas de l'urine vésicale :

Nos dosages effectués sur l'urine vésicale dès le prélèvement pour le chien II, et seulement après 4 mois pour le chien I, révèlent une proportion élevée de nalorphine liée, par rapport à la forme libre. Cette proportion est un peu réduite par l'hydrolyse enzymatique dans le cas du chien I.

Mais dans les observations de Woods (204) se rapportant à la morphine : on voit que ce rapport beaucoup plus grand traduit une proportion beaucoup plus faible de morphine liée par rapport à la morphine libre.

CINQUIÈME PARTIE

CONCLUSIONS

L'introduction de la nalorphine (N-allylnormorphine) dans la lutte contre la dépression respiratoire engendrée par la morphine et par quelques succédanés de celle-ci, peut conduire le toxicologue à une identification de cet alcaloïde proche parent de la morphine.

Nous nous sommes proposés dès lors, d'étudier le métabolisme de la nalorphine dans l'organisme animal en nous inspirant des travaux antérieurs concernant le métabolisme de la morphine, notamment ceux de Woods (201) (204), de Woods et coll. (205) et de notre maître, M. le Professeur Chambon (32) et aussi ceux de Woods et coll. (207) concernant la nalorphine.

1° Nous avons adopté, pour le dosage de la base nalorphine, la méthode colorimétrique de Woods et coll. (205) par estérification préalable par le chlorure de p. nitrobenzoyle puis complexation avec le méthylorange : méthode qui nous a donné des résultats très réguliers.

2° L'existence signalée antérieurement de « formes liées », c'est-à-dire « conjuguées » de la morphine et de la nalorphine nous a conduit à rechercher particulièrement ces dérivés et à les isoler ou à les hydrolyser en milieu acide à l'autoclave.

L'isolement de la « forme liée », soluble dans l'eau, insoluble dans l'éther et le chloroforme fut réalisé par chromatographie sur cellulose d'un extrait des urines selon la méthode de Seibert et coll. (165).

La caractérisation du conjugué de nalorphine spécialement purifiée par chromatographie, révèle d'une part la présence de la nalorphine et d'autre part celle de l'acide glycuronique selon la technique de Fishman.

3° Les caractéristiques physico-chimiques du glycuronide de nalorphine font que cette forme liée échappe à son isolement dans la méthode classique en toxicologie de Stas-Otto-Ogier-Kohn Abrest.

Nous avons cherché à démontrer son existence dans les liqueurs résiduelles demeurant après les extractions systématiques par la méthode de Stas, des urines, de la bile des chiens ayant reçu de la nalorphine.

Nous avons utilisé les méthodes précédentes de M. le Professeur Chambon et coll., adaptées de Woods. Elles nous ont révélé à côté de la nalorphine libre extraite normalement, une proportion très élevée de nalorphine liée à l'état de glycuronide.

Ainsi nous paraît comblée la lacune grave de cette méthode de Stas, par ailleurs excellente.

4° L'identification de la base nalorphine, si proche par sa constitution de la base morphine, et donnant comme elle les réactions générales des alcaloïdes et celles se rapportant à sa fonction phénol, ne peut, sur le plan toxicologique, c'est-à-dire de très faibles doses, être différenciée que par son Rf chromatographique.

Cette détermination s'effectue au mieux sur papier Whatman phosphaté selon la méthode de Munier, avec le n. butanol - eau à saturation.

Cette méthode permet aussi de différencier nettement les produits d'oxydation artificielle : aminoxyde et oxydinalorphine.

Nous avons ainsi pu identifier l'alcaloïde isolé à l'état libre ou après hydrolyse de son glycuronide et même après mélange avec la morphine.

Nous n'avons jamais rencontré d'aminoxyde ou d'oxydinalorphine au cours de nos expertises.

5° Afin de suivre le métabolisme de la nalorphine, nous avons injecté à deux chiens, par voie sous-cutanée, des doses très modérées de chlorhydrate de nalorphine. Le premier reçut la dose de 6,8 mg/kg et fut sacrifié 8 heures plus tard. Le second reçut 10 mg/kg et fut sacrifié 16 heures plus tard.

Les viscères : foie, vésicule biliaire, reins, intestin, vessie urinaire et son contenu, sang, furent recueillis, mis au réfrigérateur et soumis aux analyses en vue du dosage des formes libre et liée de la nalorphine.

6° L'urine vésicale contient près de 4,5 % de la dose de nalorphine injectée chez le chien n° 2 avec un rapport forme liée/forme libre égal à 29,2, c'est-à-dire une très forte prédominance de la forme conjuguée.

Dans le cas de la morphine ce rapport est plus faible, selon les chiffres de Woods entre 3,97 et 5,55.

7° Le contenu intestinal qui ne put être analysé qu'après quatre mois de conservation, nous permet de penser qu'il subit l'action hydrolysante des glycuronidases de l'épithélium intestinal. La quantité totale d'alcaloïde trouvée correspond à 0,11 % de la quantité injectée, mais ceci avec prédominance de la forme libre : le rapport de la forme conjuguée/forme libre égal à 1/6,6, tandis que dans le cas de la morphine Woods trouve ce rapport compris entre 1,73 et 9,08.

8° Le contenu de la vésicule biliaire correspond à des concentrations élevées de l'alcaloïde administré : 16,56 % pour le chien n° 1, c'est-à-dire

8 h après l'injection et 3,90 % chez le chien n° 2, 16 h après l'injection.

Mais dans ces deux biles, le rapport de la forme liée sur la forme libre est extrêmement élevé : 64,7 et 66,6.

Avec des quantités de nalorphine administrées beaucoup plus fortes, 30 mg/kg, Woods trouvait ce même rapport égal à 85 et dans le cas de la morphine à 129,6.

Ces chiffres révèlent toute la signification du foie dans l'opération de conjugaison glycuronique, et aussi l'importance exceptionnelle de ce prélèvement au cours d'une autopsie médico-légale.

9° Le foie, malgré les faibles concentrations rapportées au gramme d'organe, renferme, pour la totalité de l'organe, 1,17 % de la dose injectée pour le chien n° 2, avec simplement une légère prédominance de la forme conjuguée : le rapport forme liée/forme libre = 2,83.

Woods, dans le cas de la nalorphine, trouvait ce rapport voisin de 1 et dans le cas de la morphine, 5,66.

10° Les reins nous ont permis d'apprécier très nettement l'influence de la conservation, c'est-à-dire de l'altération par les glycuronidases tissulaires ou autres enzymes hydrolysants sur la répartition des formes libres et des formes liées.

Les reins du chien n° 2, analysés dès leur prélèvement, contiennent après 16 h 0,29 % de l'alkaloïde injecté. La forme liée prédomine. Le rapport forme liée/forme libre est égal à 11.

Les reins du chien n° 1 analysés après trois mois de conservation, ne contiennent qu'une proportion très faible, 0,37 % de l'alkaloïde injecté, avec prédominance de la forme libre. Le rapport forme liée/forme libre = 1/4.

Confrontant ces rapports avec ceux de Woods, nous trouvons pour la nalorphine ce même rapport égal à 1 et pour la morphine égal à 1,58.

11° Le sang du chien n° 2, en rapportant les quantités trouvées sur les échantillons prélevés au poids total du sang qui est de 1/13 du poids du corps environ, contient près de 1,75 % de l'alkaloïde injecté.

L'analyse effectuée très rapidement après le prélèvement révèle encore une nette prédominance de la forme liée : rapport forme liée/forme libre égal 6,33.

Dans les chiffres de Woods pour la nalorphine, la forme libre est égale à la forme liée.

12° La confrontation des dosages effectués dans la bile du chien n° 1 et rapportés à la totalité de la bile, selon la méthode de Woods-Chambon d'une part et selon la classique méthode de Stas donne les résultats suivants :

— méthode de Stas : 0,363 mg de nalorphine base ;

— méthode de Woods-Chambon (libre + liée) : 24 mg de nalorphine base.

Si l'on effectue le dosage selon cette dernière méthode sur les liquides résiduels de l'épuisement de la bile par la méthode de Stas, on trouve, rapportée à la totalité de la bile, la nalorphine liée = 23,490 mg exprimée en nalorphine base.

13° Nous pensons avoir rapporté dans ce travail tout l'intérêt que présente pour le toxicologue, comme pour le pharmacologue, la recherche des formes libre et conjuguée de cet alcaloïde, la nalorphine, dont le métabolisme malgré un certain parallélisme avec celui de son antagoniste, la morphine de constitution si voisine, présente cependant des particularités notables.

Malgré les biotransformations de ces alcaloïdes, nalorphine et morphine qui peuvent être thérapeutiquement associés, leur identification et leur différenciation demeurent possibles en s'adressant surtout aux formes liées, conjugués glycuroniques prédominant dans les urines et la vésicule biliaire.

Si ces derniers prélèvements sont effectués assez rapidement après l'administration du toxique et analysés dans les plus brefs délais, selon des méthodes adéquates, dont la méthode de Woods ou de M. et P. Chambon ou même celle de Stas-Otto-Ogier-Kohn-Abrest valorisée par l'hydrolyse acide ou enzymatique des liqueurs terminales considérées comme épuisées, les résultats analytiques peuvent avoir une haute valeur affirmative au cours d'une expertise médico-légale.

Vu, le Doyen :
Pour le Doyen
L'Assesseur,
Louis REVOL.

Le Président de la Thèse,
Pr. CHAMBON.

Vu et permis d'imprimer :
Lyon, le 5 Juin 1964,
Le Recteur, Président du Conseil de l'Université :
P. LOUIS.

SIXIÈME PARTIE

BIBLIOGRAPHIE

1. ABOOD (L. G.), KUN (E.). — In vitro oxydation of morphine by tissu homogenates. *Fed. Proc.*, 8, 270 (1949).
2. ACHOR (L. B.), GEILING (E. M. K.). — Modification of morphine ^{14}C distribution in selected organs by N-allylnormorphine (N.A.N.M.). *Fed. Proc.*, 14, 313 (1955).
3. ACHOR (L. B.), GEILING (E. M. K.). — Effect of N-allylnormorphine on excretion of ^{14}C labelled morphine in mice. *Proc. Soc. Exptl. Biol. N. Y.*, 84, 688-89 (1953).
4. ADAMSON (D. C. M.), HANDISYDE (F. P.). — The colorimetric determination of morphine. *Quart. J. Phar. Pharmacol*, 19, 350-59 (1946).
5. ADRIANI (J.), KERR (M.). — Clinical experiences in the use of N-allylnormorphine as an antagonist to morphine and other narcosis in surgical patients. *Surgery*, 33, 731-36 (1953).
6. AXELROD (J.). — Enzymatic N-demethylation of narcotic drugs. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 117, 322-30 (1956).
7. AXELROD (J.), COCHIN (J.). — The inhibitory action of nalorphine on the enzymatic N-demethylation of narcotic drugs. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 121, 107-12 (1957).
8. AXELROD (J.), INSCOE (J. K.). — Glucuronide formation of narcotic drugs in vitro and in vivo. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 103, 675-76 (1960).
9. AXELROD (J.), INSCOE (J. K.), TOMKINS (G. M.). — Enzymatic synthesis of N-glucosyluronic acid conjugates. *J. Biol. Chem.*, 232, 835-41 (1958).
10. AXELROD (J.), SHOFER (R.), INSCOE (J. K.), KING (W. M.), SJOERDSMA (A.). — The fate of papaverine in man and other mammals. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 124, 9-15 (1958).
11. BEAL (J. M.), SCHAPIRO (H.). — Effect of N-allylnormorphine on gastro intestinal motility. *Surgery*, 33, 65-70 (1953).
12. BECK (K.), SCHUBOTHE (H.), BAUMANN (G.). — Über die störung der glucuronidbildung beim hämolytischen ikterus und deren beeinflussung durch die milzestirpation. *Klin. Wschr.*, 40, 1041-45 (1962).
13. BECKETT (H. H.), CASEY (A. F.), HARPER (N. J.). — Analgesics and their antagonists : somme steric and chemical considerations. *J. Pharm. Pharmacol.*, 8, 874-82 (1956).

14. BEECHER (H. K.), LASAGNA (L.). — The analgesic effectiveness of nalorphine and nalorphine-morphine mixtures in man. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 113, 4-5 (1955).
15. BELFORD (J.), KAO (F. F.). — Central action of N-allylnormorphine in pentobarbital respiratory depression. *Fed. Proc.*, 13, 336 (1954).
16. BERG (P.), JOKLIK (W. K.). — Enzymatic phosphorylation of nucleoside diphosphate. *J. Biol. Chem.*, 210, 657-72 (1954).
17. BERNHEIM (F.), BERNHEIM (M. L. C.). — The oxydation in vitro of morphine by rat liver slices. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 81, 374-77 (1944).
18. BLOHM (T. R.), WILLMORE (W. J.). — Effects of N-allylnormorphine on cholinesterases. *Proc. Soc. Exptl. Biol. N. Y.*, 77, 718-21 (1951).
19. BODMAN (R. I.). — The depression of respiration by the opiates and its antagonism by nalorphine. *Proc. R. Soc. Med.*, 46, 923-30 (1953).
20. BORNSTEIN (M.), YORBRUG (N.), JOHNSTON (B.). — N-allylnormorphine in treatment of methorphan (dromoran) hydrobromide poisoning. *J.A.M.A.*, 151, 908-10 (1953).
21. BRATTON (A. C.), MARSHALL, JR (E. K.). — A new coupling component for sulfanilamide determination. *J. Biol. Chem.*, 128, 537-50 (1939).
22. BRODIE (B. B.), UDENFRIEND (S.), DILL (W.). — The estimation of basic organic compounds in biological material. V. Estimation by salt formation with methyloange. *J. Biol. Chem.*, 168, 335-39 (1947).
23. BROSSI (A.), HAFLIGER (O.), SCHNIDER (O.). — Oxy-morphinane 6. Mitteilung. Die papierchromatographische bestimmung von morphinanderivaten und die Verfolgung ihrer Ausscheidung beim Hund. *Arzneimittel Forsch*, 5, 62-66 (1955).
24. CABIB (E.), LOLOIR (L. F.), CARDINI (C. E.). — Uridine diphosphate acetylglucosamine. *J. Biol. Chem.*, 203, 1055-70 (1953).
25. CAHEN (R.), FEUER (H.). — Microméthode de dosage électrophotométrique de la morphine. *C. R. Acad. Sciences*, 208, 1907-10 (1939).
26. CAPPE (B. E.), HIMEL (S. Z.), GROSSMAN (F.). — The use of a mixture of morphine and N-allylnormorphine as an analgesic. *Amer. J. Obstet. Gyn.*, 66, 1231-34 (1953).
27. CAPPE (B. E.), PALLIN (I. M.). — Recent advances in obstetric analgesia. *J.A.M.A.*, 154, 337-79 (1954).
28. CAPUTTO (R.), LOLOIR (L. F.), CARDINI (C. E.), PALADINI (A. C.). — Isolation of the coenzyme of the galactose phosphate-glucose phosphate transformation. *J. Biol. Chem.*, 184, 333-50 (1950).
29. CARTER (R. L.), WIKLER (A.). — Use of N-allylnormorphine in early demonstration of physical dependence on potent analgesics in dogs. *Fed. Proc.*, 13, 342 (1954).
30. CHAMBON (M.). — Fascicule de travaux pratiques de toxicologie de 4^e année de Pharmacie. Faculté mixte de Médecine et de Pharmacie de Lyon.
31. CHAMBON (M.). — Considérations sur l'altération de certains alcaloïdes au cours de leur extraction par les solvants organiques riches en peroxydes. Extrait du IX^e Congrès des Sociétés de Pharmacie de France, Clermont-Ferrand, juin 1957.

32. CHAMBON (M.), CHAMBON (P.). — Considérations sur de nouvelles méthodes de recherche de la morphine au cours d'une expertise toxicologique. *Ann. Med. Leg.*, 41, 35-41 (1961).
33. CHASE (H. F.), BOYD (R. S.), ANDREWS (P. M.). — N-allylnormorphine in treatment of dihydromorphinone and methorphanin overdose. *J.A.M.A.*, 150, 1103-1104 (1952).
34. COCHIN (J.), AXELROD (J.). — Biochemical and pharmacological changes in the rat following chronic administration of morphine, nalorphine and normorphine. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 125, 105-10 (1959).
35. COCHIN (J.), HAGGART (J.), WOODS (L. A.), SEEVERS (M. H.). — Plasma levels, urinary and fecal excretion of morphine in non tolerant and tolerant dogs. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 111, 74-83 (1954).
36. COOPER (Peter). — Notes on nalorphine. *The Pharm. J.*, 173, 145-6 (1954).
37. COSTA (P. J.), BONNYCASTLE (D. D.). — The effect of levallorphan tartrate, nalorphine HCl, and Win 7681 (1 allyl- 4 phényl- 4 carbethoxypiperidine) on respiratory depression and analgesia induced by some active analgetics. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 113, 310-18 (1955).
38. Council on Pharmacy and Chemistry. Nalorphine hydrochloride. *J.A.M.A.*, 152, 45-46 (1953).
39. CURRY (A. S.), POWELL (H.). — Paper chromatographic examination of the alkaloïd extract in toxicology. *Nature*, 173, 1143-44 (1954).
40. DEEVERS (S.), HOFF (H. E.), HUGGINS (R. A.). — The effects of nalorphine on the respiratory patterns of dogs. *Arch. Intern. Pharmacodyn.*, 136, 193-203 (1962).
41. DEICHMANN (W. B.). — The qualitative estimation of glucuronates in urine. *J. Lab. Clin. Med.*, 28, 770-78 (1943).
42. DELAVEAU (P. G.). — La nalorphine, antidote de la morphine. Thèse Doctorat Médecine, Paris (1954).
43. DELIGNÉ (P.). — Experimental and clinical study of the analgesic effects of N-allylnormorphine administred rectally. *Anesth. Analg.*, 16 (2), 775-84 (1959).
44. DELIGNÉ (P.). — La N-allylnormorphine (nalorphine), intérêt en anesthésiologie chirurgicale et médicale. *Anesth. Analg.*, 15 (2), 206-20 (1958).
45. DISCHE (Z.). — A new specific color reaction of hexuronic acids. *J. Biol. Chem.*, 167, 189-98 (1947).
46. DOMINO (E. F.), PELIKAN (E. W.), TRAUT (E. F.). — Nalorphine (nalline) antagonism to racemorphan (dromoran) intoxication. *J.A.M.A.*, 153, 26-7 (1953).
47. DREVON (B.). — Recherches chimiques, toxicologiques et biologiques sur l'oxydimorphine. Thèse Pharmacie (Etat), Lyon (1931).
48. DRIPPS (R. D.). — Opiate antagonism. *Am. Pract. Digest. Treat.*, 4, 123-27 (1953).
49. DULFANO (M. J.), MACK (F. X.), SEGAL (M. S.). — Treatment of respiratory acidosis with N-allylnormorphine (nalline). *New-England J. Med.*, 248, 931-34 (1953).
50. DUTTON (G. J.). — Uridine diphosphate glucuronic acid as glucuronyl donor in the synthesis of « Ester », aliphatic and steroid glucuronides. *Biochem. J.*, 64, 693-701 (1956).

51. DUTTON (G. J.), STOREY (I. D. E.). — Uridine compounds in glucuronic acid metabolism. I. The formation of glucuronides in liver suspensions. *Biochem. J.*, 57, 275-83 (1954).
52. DUTTON (G. J.), STOREY (I. D. E.). — The isolation of a compound of uridine diphosphate and glucuronic acid from liver. *Biochem. J.*, 53, XXXVII-VIII (1953).
53. ECKENHOFF (J. E.), ELDER (J. D.), KING (B. D.). — N-allylnormorphine in the treatment of morphine or demerol narcosis. *Am. J. Med. Sc.*, 223, 191-97 (1952).
54. ECKENHOFF (J. E.), ELDER (J. D.), KING (B. D.). — The effect of N-allylnormorphine in treatment of opiate overdose. *Am. J. Med. Sc.*, 222, 115 (1951).
55. ECKENHOFF (J. E.), FUNDERBURG (L. W.). — Observations on the use of the opiate antagonists nalorphine and levallorphan. *Am. J. Med. Sc.*, 228, 546-53 (1954).
56. ECKENHOFF (J. E.), HOFFMAN (G. L.), DRIPPS (R. D.). — N-allylnormorphine: antagonist to opiates. *Anesthesiology*, 13, 242-51 (1952).
57. ECKENHOFF (J. E.), HOFFMAN (G. L.), FUNDERBURG (L. W.). — N-allylnormorphine: a antagonist to neonatal narcosis produced by parturient sedation. *Am. J. Obst. and Gyn.*, 65, 1269-75 (1953).
58. ELLIOTT (H. W.), TOLBERT (B. M.), ADLER (T. K.), ANDERSON (H. H.). — Excretion of carbon¹⁴ by man after administration of morphine N-methyl C¹⁴. *Proc. Soc. Exptl. Biol. and Med.*, 85, 77-81 (1954).
59. FABRE (R.). — Le sort de la morphine dans l'organisme. *J. Pharmacie*, 30, 183-87 (1924).
60. FISHMAN (W. H.), GREEN (S.). — Microanalysis of glucuronide, glucuronic acid as applied to β glucuronidase and glucuronic acid studies. *J. Biol. Chem.*, 215, 527-37 (1955).
61. FOLDES (F. F.), ZEEDICK (F. J.), KOUKAL (L. R.). — The effects of narcotic analgetics and narcotic antagonists on respiration. *Am. J. M. Sc.*, 233, 153-61 (1957).
62. FRANÇOIS (M.), SEGIN (L.). — Sur la préparation d'un iodobismuthate de quinine amorphe et son analyse. *J. Pharm. Chim.*, série 8, 2, 59-69 (1925).
63. FRASER (H. F.). — Human pharmacology and clinical uses of nalorphine (N-allylnormorphine). *Med. Clin. N. America*, 41, 393-403 (1957).
64. FRASER (H. F.), VAN-HORN (G. D.), ISBELL (H.). — Studies on N-allylnormorphine in man: antagonism to morphine and heroin and effects of mixtures of N-allylnormorphine and morphine. *Am. J. M. Sc.*, 231, 1-8 (1956).
65. FRASER (H. F.), WIKLER (A.), EISENMAN (A. J.), ISBELL (H.). — Use of N-allylnormorphine in the treatment of methadone poisoning in man. *J. A. M. A.*, 148, 1205-7 (1952).
66. FROMHERZ (K.), PELLMONT (B.). — Morphinantagonisten. *Experientia*, 8, 394-5 (1952).
67. FUJIMOTO (J. M.). — Isolation of a purified form of bound morphine from human urine, *Fed. Proc.*, 15, 425 (1956).
68. FUJIMOTO (J. M.), WAY (E. L.). — Studies on the structure of bound morphine. *J. Amer. Pharm. Ass. Sci. Ed.*, 47, 273-5 (1959).

69. FUJIMOTO (J. M.), WAY (E. L.). — Isolation and crystallization of bound morphine from urine of human addicts. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 121, 340-6 (1957).
70. FUJIMOTO (J. M.), WAY (E. L.). — Characterization of a bound form of morphine in human urine. *Fed. Proc.*, 13, 356 (1954).
71. FUJIMOTO (J. M.), WAY (E. L.), HINE (C. H.). — Rapid method for estimation of morphine. *J. Lab. Clin. Med.* 44, 627-35 (1954).
72. GIARMAN (N. J.), CONDOURIS (G. A.). — The antidiuretic action of morphine and some of its analogs. *Arch. Intern. Pharmacodyn.*, 97, 28-33 (1954).
73. GLAZKO (A. J.), WOLF (L. M.), DILL (W. A.). — Biochemical studies on chloramphenicol (chloromycetin). I/. Colorimetric method for the determination of chloramphenicol and related nitro compounds. *Arch. Bioch.*, 23, 411-18 (1949).
74. GREENE (B. A.). — Nalorphine in depression of the new born. *Am. J. Obst. Gyn.*, 70, 618-22 (1955).
75. GROSS (E. G.). — Effect of liver damage on urinary morphine excretion. *Proc. Soc. Exptl. Bio. Med.*, 51, 61-3 (1942).
76. GROSS (E. G.), THOMPSON (V.). — The excretion of a combined form of morphine in tolerant and non tolerant dogs. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 68, 413-8 (1940).
77. GRUBER Jr (C. M.). — The effect of N- allylnormorphine in the presence of secobarbital. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 111, 409-12 (1954).
78. GRUBER, Jr (C. M.), GRUBER (C. M.). — N-allylnormorphine as an antagonist to the intestinal spasm produced by the addicting analgesics. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 109 157-8 (1953).
79. GUYOT (J. M. F.). — Contribution à l'étude toxicologique de la morphine. Thèse D^r Pharm. Univ. Bordeaux (1929).
80. HAGGART (J.), WOODS (L. A.), SEEVERS (M. H.). — Studies on the antagonism of morphine hypotension in the dog. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 110, 23-4 (1954).
81. HART (E. R.). — Further observations on antagonistic actions of N-allylnormorphine against morphine. *Fed. Proc.*, 2, 82 (1943).
82. HART (E. R.). — N-allylnorcodeine and N-allylnormorphine, two antagonists to morphine. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 72, 19 (1941).
83. HART (E. R.), MC CAWLEY (E. L.). — The pharmacology of N-allylnormorphine as compared with morphine. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 82, 339-48 (1944).
84. HAZARD (R.). — La N-allylmorphine, antagoniste de la morphine. Recherches sur la spécificité de son action antidote à l'égard des dépresseurs de la respiration. *Thérapie*, 9, 43-8 (1954).
85. HAZARD (R.), DELAVEAU (P.). — Recherche sur l'antagonisme entre nalorphine et morphine et quelques-uns de ses dérivés sur la respiration du lapin. *La Semaine des Hôpitaux*, Pathol. et Biol., n° 16; *Arch. Biol. Med.*, n° 6, P. et B., 1339-51 (1956).
86. HEIMANN (H.). — Pharmakologische untersuchung über nor-morphinderivate. *Zeitschrift für Experimentelle Pathologie und Therapie*, 17, 342-69 (1915).

87. HOSOYA (E.), BRODY (M. T.). — In vitro oxydation of morphine by rat tissue homogenates. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 120, 504-11 (1957).
88. HUG, Jr (C. C.), WOODS (L. A.). — The distribution of tritium labelled nalorphine in the central nervous system of dogs. *Fed. Proc.*, 19, 271 (1960).
89. HUGGINS (R. A.), GLASS (W. G.), BRYAN (A. R.). — Protective action of N-allylnormorphine against the respiratory depression produced by some compounds related to morphine. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 101, 19 (1951).
90. HUGGINS (R. A.), GLASS (W. G.), BRYAN (A. R.). — Cardiovascular effect of some narcotics. *Arch. Internat. Pharmacodyn.*, 86, 112-20 (1951).
91. HUGGINS (R. A.), GLASS (W. G.), BRYAN (A. R.). — Protective action of N-allylnormorphine against respiratory depression produced by some compounds related to morphine. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 75, 540-1 (1950).
92. HUGGINS (R. A.), MOYER (J. H.). — Some effects of N-allylnormorphine on normal subjects and a review of the literature. *Anesthesiology*, 16, 82-9 (1955).
93. IRWIN (S.), SEEVERS (M. H.). — Acute and antagonistic effects of nalorphine in the monkey. *Fed. Proc.*, 13, 369 (1954).
94. IRWIN (S.), SEEVERS (M. H.). — Comparative study of regular and N-allylnormorphine induced withdrawal in monkeys addicted to morphine, 6-methyldihydromorphine, dromoran, methadone, ketobemidone. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 106, 397 (1952).
95. ISBELL (H.). — Attempted addiction to nalorphine. *Fed. Proc.*, 15, 442 (1956).
96. ISBELL (H.). — Nalline — A specific narcotic antagonist. *Merck Report*, 62, 23-6 (1953).
97. ISBELL (H.), FRASER (H. F.). — Addiction to analgesics and barbiturates. *Pharmacol. Rev.*, 2, 355-97 (1950).
98. ISBELL (H.), FRASER (H. F.). — Action and addiction liability of the dithienylbutenylamines in man. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.* 109, 417-21 (1953).
99. ISBELL (H.), FRASER (H. F.), WIKLER (A.). — Addiction liability of dithienylbutenylamines. *Fed. Proc.*, 12, 333 (1953).
100. ISSELBACHER (K. J.), AXELROD (J.). — Enzymatic formation of corticosteroid glucuronide. *J. Am. Chem. Soc.*, 77, 1070-71 (1955).
101. JORPES (E.), BERGSTRÖM (S.). — Heparin: a mucoitin polysulfuric acid. *J. Biol. Chem.*, 118, 447-57 (1937).
102. KAYMAKALAN (S.), WOODS (L. A.). — Nalorphine induced « abstinence syndrom » in morphine — tolerant albinos rats. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 117, 112 (1956).
103. KAYMAKALAN (S.), WOODS (L. A.). — Reponse of morphine — tolerant dogs and rats to methimazole and or nalorphine. *Fed. Proc.*, 13, 373 (1954).
104. KAISER (H.), JORI (H.). — Beiträge zum toxikologischen Nachweis von Dromoran « Roche » Morphin, Dilaudid, Cardiazol, Coramin und Atropin mit Hilfe der Papier Chromatographie. *Arch. Pharm.*, 287, 224-42 (1954).

105. KEATS (A. S.), MITHOEFER (J.). — Nature of antagonism of nalorphine to respiratory depression induced by morphine in man. *Fed. Proc.*, 14, 356 (1955).
106. KEATS (A. S.), TELFORD (J.). — Subjective effects of nalorphine in hospitalized patients. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 119, 370-77 (1953).
107. KEATS (A. S.), TELFORD (J.). — Nalorphine, a potent analgesic in man. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 117, 190-96 (1956).
108. KEITH (E. F.), DEBOER (B.). — N-allylnormorphine block of narcotic induced hyperglycemia in rabbits. *Fed. Proc.*, 13, 374 (1954).
109. KOPPANYI (T.), KARCZMAR (A. G.). — Nature of antagonism between N-allylnormorphine (nalline) and morphine. *Fed. Proc.*, 12, 337 (1953).
110. LASAGNA (L.). — Nalorphine (N-allylnormorphine). *Arch. Internal. Med.*, 94, 532- 56 (1954).
111. LASAGNA (L.), BEECHER (H. K.). — The analgesic effectiveness of nalorphine and nalorphine-morphine combinations in man. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 112, 356-63 (1954).
112. LEVI (L.), FARMILO (C. G.). — Reaction of morphine with potassium-mercuric Iodide. *Analyt. Chemistry*, 26, 1040-46 (1954).
113. LEVY (M.), DOISY (E. A.). — The effect of borate on the oxydation of glucose and other sugars. *J. Biol. Chem.*, 77, 733-51 (1928).
114. LUND (H.). — Electroörganic preparations : V. On the polarographic determination of phenols after treatment with nitrous acid. *Acta. Chem. Scand.*, 12, 1444-50 (1958).
115. MARCH (C. H.), ELLIOTT (H. W.). — Distribution and excretion of radioactivity after administration of morphine N-methyl C¹⁴ to rats. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 86, 494-97 (1954).
116. MARCH (C. H.), ELLIOTT (H. W.). — Biological studies with radioactive morphine. *Fed. Proc.*, 11, 373 (1952).
117. MARX (F. J.), LOVE (J.). — Effectiveness of N-allylnormorphine in the management of acute morphine poisoning. *Ann. Intern. Med.*, 39, 635-40 (1953).
118. MATTILA (M.). — The effects of morphine and nalorphine on the small intestine of normal and morphine tolerant rat and guinea-pig. *Acta Pharmacol. Toxicol.*, 19, 47-52 (1962).
119. McCRAWLEY (E. L.), HART (E. R.), MARSH (D. F.). — Preparation of N-allylnormorphine. *J. Am. Chem. Soc.*, 63, 314, (1941).
120. MELLETT (L.B.), WOODS (L. A.). — Excretion of urinary N-C¹⁴ methylmorphine and pulmonary C¹⁴O₂ in the monkey and dog after subcutaneous injection of the labelled drug. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 106, 221-3 (1961).
121. MELLETT (L. B.), WOODS (L. A.). — Distribution and fate of morphine in non tolerant and tolerant monkey. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 116, 77-83 (1956).
122. MILLER (J. W.), ANDERSON (H. H.). — The effect of N-demethylation on certain pharmacologic actions of morphine, codeine and meperidine in the mouse. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 112, 191-96 (1954).
123. MILLER (J. W.), GILFOIL (G.), SHIDEMAN (F. E.). — The effects of levallorphan tartrate (levo-3-hydroxy-N-allylmorphinan tartrate) on the respi-

- ration of rabbits given morphine. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 115, 350-59 (1955).
124. MILTHERS (K.). — The in vivo transformation of morphine and nalorphine into normorphine in the brain of rats. *Acta. Pharmacol. Toxicol.*, 19, 235-40 (1962).
125. MILTHERS (K.). — N-dealkylation of morphine and nalorphine in the brain of living rats. *Nature*, 195, 607 (1962).
126. MILTHERS (K.). — Normorphine, nalorphine and morphine quantitative separation and determination of small amounts in bloods and tissues. *Acta. Pharmacol. Toxicol.*, 18, 199-206 (1961).
127. MILTHERS (K.). — Polarographic determination of small amounts of morphine in tissues. *Acta. Pharmacol. Toxicol.*, 16, 10-12 (1959).
128. MILTHERS (K.). — Polarographic determination of small amounts of morphine in blood and plasma. *Acta. Pharmacol. Toxicol.*, 15, 21-28 (1958).
129. MISRA (A. L.), MULÉ (S. J.), WOODS (L. A.). — The preparation of tritium nuclear-labelled morphine and evidence for its in vivo biotransformation to normorphine in the rat. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 132, 317-22 (1951).
130. MUEHLENBECK (H. E.), WOODS (L. A.). — Plasma levels and urinary excretion of nalorphine in the dog. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 113, 40-1 (1955).
131. MUNIER (R.). — Séparation des alcaloïdes de leurs N-oxydes par microchromatographie sur papier. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 35, 1225-1231 (1953).
132. MUNIER (R.). — Microchromatographie de partage des alcaloïdes et de diverses bases azotées biologiques. Thèse Ingénieur-Docteur, Paris (1950).
133. MUNIER (R.), MACHEBŒUF (M.). — Microchromatographie de partage sur papier des alcaloïdes et de diverses bases azotées biologiques. III. Exemples de séparations de divers alcaloïdes par la technique en phase solvante acide (Famille de l'atropine, de la cocaïne, de la nicotine, de la spartéine, de la strychnine et de la corynanthine). *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 33, 846-56 (1951).
134. MUNIER (R.), MACHEBŒUF (M.). — Microchromatographie de partage des alcaloïdes et de diverses bases azotées biologiques. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 31, 1144-62 (1949).
135. MUNIER (R.), MACHEBŒUF (M.), CHERRIER (N.). — Microchromatographie des alcaloïdes et des bases azotées biologiques sur papier traité préalablement par des sels. I. Essais préliminaires sur les papiers phosphatés. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 33, 1919-29 (1951).
136. MULÉ (S. J.), WOODS (L. A.), MELLETT (L. B.). — Effect of nalorphine in the central nervous system of non tolerant dogs and observations on metabolism. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 136, 242-49 (1962).
137. OBERST (F. W.). — Relationship of chemical structure of morphine derivatives to their urinary excretion in free and bound forms. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 73, 401-4 (1941).
138. OBERST (F. W.). — Free and bound morphine in the urine of morphine addicts. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 69, 240-51 (1940).

139. OBERST (F. W.). — The determination of morphine in the urine of morphine addicts. *J. Lab. Clin. Med.*, 24, 318-29 (1939).
140. ORAHOVATS (P. D.), WINTER (C. A.), LEHMAN (E. G.). — Pharmacological studies of mixtures of narcotics and N-allylnormorphine. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 112, 246-51 (1954).
141. ORAM (J. B.). — Colorimetric determination of morphine. *Am. J. Pharm.*, 122, 60-66 (1950).
142. ORTON (R. H.), PEACOCK (J.), PHILIPS (G.). — Allylnormorphine. *Anaesthesia*, 9, 88-91 (1954).
143. PAERREGAARD (P.). — The fate of morphine in the organism. *Arch. Pharm. Chem.*, 67, 1-6 (1960).
144. PAERREGAARD (P.). — A new method for quantitative determination of small amounts of morphine in human urine. *Acta. Pharmacol. Toxicol.*, 14, 38-52 (1957).
145. PAERREGAARD (P.). — Excretion of morphine in the urine of non addicts. *Acta. Pharmacol. Toxicol.*, 14, 53-7 (1957).
146. PAERREGAARD (P.); POULSEN (E.). — Excretion of morphine in the urine of non tolerant dogs. *Acta. Pharmacol. Toxicol.*, 14, 390-3 (1958).
147. PAPADOPOULOS (C. N.), KEATS (A. S.). — Specific and non specific antagonism of morphine induced respiratory depression. *Anesthesiology* 23, 86-91 (1962).
148. PARK (J. T.). — Uridine — 5' — pyrophosphate derivatives. I. Isolation from staphylococcus aureus. *J. Biol. Chem.*, 194, 877-84 (1952).
149. PARK (J. T.). — Uridine — 5' — pyrophosphate derivatives. II. A structure common to three derivatives. *J. Biol. Chem.*, 194, 885-95 (1952).
150. PATERSON (S. J.), PRESCOTT (F.). — Nalorphine in the prevention of neonatal asphyxia due to maternal sedation with pethidine. *Lancet*, 266, 490-93 (1954).
151. PEDLEY (E.). — The microchemical differentiation of morphine and nalorphine. *J. Pharm. Pharmacol.*, 7, 527-32 (1955).
152. PETERSEN (M. A.), KALCKAR (H. M.), CUTOLO (E.), SMITH (E. E. B.). — Uridyl transferases and the formation of uridine triphosphate. *Nature*, 172, 1036-37 (1953).
153. POLH (J.). — Ueber das N-allylnorcodein, einen antagonisten des morphins. *Zeitschrift für experimentelle pathologie und therapie*, 17, 342-69 (1915).
154. PONTIUS (R.), MORRIS (G.), HERSCHBERGER (R.). — Cerebral effect of morphine and N-allylnormorphine. *Fed. Proc.*, 14, 380 (1955).
155. RADOFF (L. M.), HUGGINS (S. E.). — Protective action of N- allylnormorphine against demerol. *Proc. Exptl. Biol. Med.*, 78, 879-80 (1951).
156. RADOUCO-THOMAS (C.). — Morphinomimétiques et morphinobloquants en anesthésie générale. *Anesth. Analg.*, 14, 633 (1957).
157. RASMUSSEN (H. B.), BOLL (P. M.). — On the caractérisation of 2-nitromorphine. *Acta. Chem. Scand.*, 12, 885-90 (1958).
158. SALOMON (A.), MARCUS (P. S.), HERSCHFUS (J. A.), SEGAL (J. S.). — N-allylnormorphine (Nalline) : action on narcotized subjects. *Am. J. Med.*, 17, 214-22 (1954).
159. SCHAPIRO (H.), BEAL (J. M.). — The effect of N-allylnormorphine on the choledochal sphincter action. *Surgery*, 34, 870-73 (1953).

160. SCHMID (R.), HAMMAKER (L.), AXELROD (J.). — The enzymatic formation of bilirubin glucuronide. *Arch. Biochem. Biophys.*, 70, 285-88 (1957).
161. SEAGERS (W. J.), NEUSS (J. D.), MADER (W. J.). — The identification and determination of N-allylnormorphine hydrochloride. *J. Am. Pharm. Ass. Sci. Ed.*, 41, 640-42 (1952).
162. SEEVERS (M. H.). — Adaptation to narcotics. *Fed. Proc.*, 13, 672 (1954).
163. SEEVERS (M. H.), WOODS (L. A.). — The phenomena of tolerance. *Am. J. Med.*, 14, 546-57 (1953).
164. SEIBERT (R. A.), HUGGINS (R. A.). — Conjugaison of N-allylnormorphine by liver slices. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 82, 518-19 (1953).
165. SEIBERT (R. A.), WILLIAMS (C. E.), HUGGINS (R. A.). — The isolation and identification of bound morphine. *Science*, 120, 222-23 (1954).
166. SHAW (F. H.), BENTLEY (G.). — Morphine antagonism. *Nature Lond.*, 169, 712-13 (1952).
167. SHAW (F. H.), BENTLEY (G.). — Some aspect of the pharmacology of morphine, with special reference to its antagonism by 5-Amino.acridine and other chemically related compounds. *Med. J. Aust.*, 2, 868-74 (1949).
168. SHIDEMAN (F. E.), KELLY (A. R.). — Adaptation of the silicomolybdc acid method for the estimation of morphine to the photoelectric colorimeter. *Science*, 106, 298-99 (1947).
169. SIMONNET (H.). — Contribution à l'étude du sort de la morphine dans l'organisme animal. *C. R. Acad. Sc.*, 204, 1371-72 (1937).
170. SMITH (C. C.), LEHMAN (E. G.), GILFILLAN (J. L.). — Antagonistic action of N-allylnormorphine upon the analgesic and toxic effects of morphine, methadone derivatives and isonepeccaine. *Fed. Proc.*, 10, 335-36 (1951).
171. SMITH (C. C.), MILLS (G. T.). — Uridine nucleotide compounds of liver. *Biochem. Biophys. Acta*, 13, 386-400 (1954).
172. SNYDER (F. F.). — Action of N-allylnormorphine upon the fetus. *Fed. Proc.*, 13, 142 (1954).
173. SNYDER (F. F.). — Action of N-allylnormorphine during labor. *Fed. Proc.*, 12, 136 (1953).
174. STOREY (I. D. E.), DUTTON (G. J.). — The isolation and structure of « uridine diphosphate glucuronic acid ». *Biochem. J.*, 59, 279-88 (1955).
175. STREET (H. V.). — The paper chromatographic separation of codeine, morphine and nalorphine. *J. Pharm. Pharmacol.*, 14, 56-7 (1962).
176. STROBER (M.). — Treatment of acute heroin intoxication with nalorphine (nalline). *J. A. M. A.*, 154, 327-28 (1954).
177. STROMINGER (J. L.), KALCKAR (H. M.), AXELROD (J.), MAXWELL (E. S.). — Enzymatic oxydation of uridine diphosphate glucose to uridine diphosphate glucuronic acid. *J. Am. Chem. Soc.*, 76, 6411-2 (1954).
178. TAKEMORI (A. E.). — Enzymatic studies on morphine glucuronide synthesis in acutely and chronically morphinized rats. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 130, 370-74 (1960).
179. TAKEMORI (A. E.). — Metabolic N and O demethylation of morphine and morphinane type analgetics. *Dissert. Abstr.*, 18, 2165-66 (1958).

180. TAKEMORI (A. E.), MANNERING (G. J.). — Metabolic N and O demethylation of morphine and morphinan-type analgesics. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 123, 171-79 (1958).
181. TENNEY (S. M.), MITHOEFER (J. D.). — The respiratory depressant action of N-allylnormorphine in the normal subject and in patients with respiratory acidosis secondary to pulmonary emphysema. *New. England. J. Med.*, 249, 886-90 (1953).
182. TERRY (J. G.), BRAUMOELLER (F. L.). — Nalorphine : an aid in detecting narcotic users. *Californi. M.*, 85, 299-301 (1956).
183. THOMPSON (V.), GROSS (E. G.). — Excretion of combined morphine in the tolerant and non tolerant dog. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 72, 138-45 (1941).
184. TOMPSETT (S. L.). — The separation of alkaloids from extracts of animal tissues ; the use of cation exchange resins. *Acta. Pharmacol. Toxicol.*, 18, 414-18 (1961).
185. TOMPSETT (S. L.). — The separation of alkaloids and related substances from urine ; the use of cation exchange resins. *Acta. Pharmacol. Toxicol.*, 17, 295-303 (1960).
186. UNNA (K.). — Antagonistic effect of N-allylnormorphine upon morphine. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 79, 27-31 (1943).
187. VIVANTE (A.), KAO (F. F.). — The effect of N-allylnormorphine on the respiration of dogs anesthetized with pentobarbital sodium. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 110, 50-52 (1954).
188. VIVANTE (A.), KAO (F. F.), BELFORD (J.). — The effect of nalorphine on the respiration of dogs anesthetized with pentobarbital sodium. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 111, 436-46 (1954).
189. VIVANTE (A.), KAO (F. F.), BELFORD (J.). — The effect of nalorphine on the respiration of dogs anesthetized with pentobarbital sodium. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 111, 343-46 (1954).
190. VON BRAUN (J.). — Untersuchungen über morphium alkalöide. III. Mitteilung. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, 49, 877-89 (1916).
191. VON BRAUN (J.). — Untersuchungen über morphium alkalöide. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, 47, 2312-30 (1914).
192. WEAKLEY (L. S.), BERGNER (R. P.). — The respiratory effects of N-allylnormorphine in secobarbital sodium narcosis. *Anesthesiology*, 14, 603-9 (1957).
193. WEIJLARD (J.), ERICKSON (A. E.). — N-allylnormorphine. *J. Am. Chem. Soc.*, 64, 869-70 (1942).
194. WIKLER (A.). — Effects of large doses of N-allylnormorphine on man. *Fed. Proc.*, 10, 345 (1951).
195. WIKLER (A.), CARTER (R. L.), FRASER (H. F.), ISBELL (H.). — Precipitation of « abstinence syndroms » by single doses of N-allylnormorphine in addicts. *Fed. Proc.*, 11, 402 (1952).
196. WIKLER (A.), FRASER (H.), ISBELL (H.). — N-allylnormorphine : effects of single doses and precipitation of acute « abstinence syndroms » during addition to morphine methadone or heroin in man (post addicts). *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 109, 8-20 (1953).

197. WINTER (C. A.), FLATAKER (L.). — Effects of N-allylnormorphine upon massive doses of narcotic drugs. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 93, 158-60 (1956).
 198. WINTER (C. A.), GAFFNEY (C. E.). — The effect of N-allylnormorphine upon the antidiuretic action of morphine. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 110, 53-54 (1954).
 199. WINTER (C. A.), GAFFNEY (C. E.), FLATAKER (L.). — The effect of N-allylnormorphine upon the antidiuretic action of morphine. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 111, 360-64 (1954).
 200. WINTER (C. A.), ORAHOVATS (P. D.), FLATAKER (L.), LEHMAN (E. G.), LEHMAN (J. T.). — Studies on the pharmacology of N-allylnormorphine. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 111, 152-60 (1954).
 201. WOODS (L. A.). — Comparative distribution of morphine and nalorphine in the dog brain. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 120, 58-62 (1957).
 202. WOODS (L. A.). — The pharmacology of nalorphine (N-allylnormorphine). *Pharmacol. Rev.*, 8, 175-98 (1956).
 203. WOODS (L. A.). — Identification of morphine glucuronide as metabolite in dog bile and urine. *Fed. Proc.*, 13, 419 (1954).
 204. WOODS (L. A.). — Distribution and fate of morphine in non tolerant and tolerant dogs and rats. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 112, 158-75 (1954).
 205. WOODS (L. A.), COCHIN (J.), FORNEFELD (E. G.), SEEVERS (M. H.). — Estimation of morphine in biologic material. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 111, 64-73 (1954).
 206. WOODS (L. A.), COCHIN (J.), FORNEFELD (E. G.), McMAHON (F. G.), SEEVERS (M. H.). — The estimation of amines in biological material with critical data for cocaine and mescaline. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 101, 188-99 (1951).
 207. WOODS (L. A.), MUEHLENBECK (H. E.). — Distribution and fate of nalorphine in the dog and rat. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 120, 52-7 (1957).
 208. ZAUDER (H. L.). — Antagonistic effect of N-allylnormorphine on morphine induced hyperglycemia. *Fed. Proc.*, 11, 405 (1952).
-

Imprimé en France. — Imprimerie JOUVE, 15, rue Racine, PARIS (6^e). — 6-1964
N^o d'édition : 157. — Dépôt légal : 2^e trimestre 1964
